

**UNIVERZITA KARLOVA**

**1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**Postgraduální doktorské studium biomedicíny**

Studijní program: Biologie a patologie buňky



**Mgr. Jan Hartinger**

**Molekulární podstata etiologie toxického působení fluoropyrimidinů se zaměřením na palmární-plantární erythrodysesthesii a použití potenciálních antidot**

*Molecular basis of fluoropyrimidine toxic effect etiology with focus on palmar-plantar erythrodysesthesia and potential antidote use*

Disertační práce

Školitel: MUDr. Pavel Veselý, CSc.

Školitel konsultant: PharmDr. Irena Štenglová Netíková, PhD.

Praha, 2017

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze 20. 1. 2017

Jan Hartinger

## Identifikační záznam:

HARTINGER, Jan. *Molekulární podstata etiologie toxického působení fluoropyrimidinů se zaměřením na palmární-plantární erythrodysesthesii a použití potenciálních antidot. [Molecular basis of fluoropyrimidine toxic effect etiology with focus on palmar-plantar erythrodysesthesia and potential antidote use]*. Praha, 2017. 116 stran, 5 příloh. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav buněčné biologie a patologie. Školitel Veselý Pavel.

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěl velmi poděkovat svým školitelům PharmDr. Ireně Štenglové Netíkové, PhD. a MUDr. Pavlovi Veselému, CSc., pod jejichž odborným vedením tato disertační práce vznikla.

Za cenné rady při publikaci výsledků děkuji RNDr. Evě Matouškové, za asistenci v laboratoři paní Anně Bláhové.



## Abstrakt (teze):

Palmární-plantární erythrodysesthesie (PPE) je nežádoucí účinek doprovázející antineoplastickou terapii při podávání 5-fluorouracilu formou kontinuální infuze, případně při dlouhodobé terapii kapecitabinem (proléčivo 5-FU). V nejzávažnějších případech PPE znemožňuje další pokračování v potřebné terapii. V léčbě a prevenci tohoto nežádoucího účinku je používána lokální aplikace uridinu ve formě 10 % masti, nicméně tento postup nebyl dosud ověřen randomizovanými studiemi a není všeobecně přijímán. PPE je způsobena s největší pravděpodobností přímým vlivem cytostatika na kůži dlaní a plosek nohou. Toxicita 5-FU je zprostředkována především jeho inkorporací do RNA a inhibicí thymidylát synthasy (TS), která vyústí v poruchu syntesy DNA. U odlišných typů buněk mají tyto mechanismy pro rozvoj toxicity 5-FU různý význam. Při hledání specifického antidota v terapii PPE je proto nezbytné zjistit jaký molekulární mechanismus toxicity 5-FU se uplatňuje u keratinocytů.

Jako nejvhodnější látky pro použití v lokální terapii PPE jsme vybrali pyrimidinové nukleosidy, především uridin, který je ve formě 10 % uridinové masti v této indikaci využíván v několika onkologických centrech ve Střední Evropě. Jako prostředek pro zjištění mechanismu působení 5-FU jsme dále testovali účinek kalciumfolinátu (CF), který zesiluje inhibici thymidylát synthasy 5-fluorouracilem. Jako další potenciální antidota jsme studovali uracil a pyridoxin. Pro ověření potenciálu jednotlivých látek antagonisovat toxické účinky 5-FU jsme provedli *in vitro* testy na buněčné linii spontánně imortalizovaných lidských keratinocytů HaCaT. Některé testy jsme zopakovali rovněž na primárních keratinocytech. Použili jsme 3 rozdílné a vzájemně se doplňující metody testování viability buněk: mikroskopické hodnocení vývoje morfologických změn dokumentovaných mikrofotografiemi, hodnocení metabolické aktivity pomocí MTT testu a hodnocení časového vývoje adherence buněk k podkladu pomocí RTCA testu.

Uridin významně prodlužoval přežití buněk v přítomnosti 5-FU. Uridin zabraňuje inkorporaci 5-FU do RNA a lze tedy dovozovat, že tento mechanismus účinku 5-FU je pro HaCaT keratinocyty zásadní. Pokud jsme k uridinu přidali thymidin, došlo k dalšímu nárůstu metabolické aktivity a prodloužení přežití buněk. Tento efekt byl spíše synergický než aditivní. Samotný thymidin přežívání buněk neprodlužoval. Lze tedy dovozovat, že thymidin, který snižuje význam inhibice TS 5-fluorouracilem, prodlužuje přežití buněk až v případě, že

je zablokována inkorporace 5-FU do RNA. Tuto hypotézu jsme potvrdili rovněž pomocí CF, který toxicitu 5-FU zvyšoval pouze v případě, že jsme zablokovali inkorporaci 5-FU do RNA uridinem. Pokud na buňky působil samotný 5-FU, nebyla toxicita přidáním CF zvýšena. Uridin tedy „přepíná“ mechanismus toxicity z RNA inkorporace na inhibici TS, která může být dále zesílena CF. V případě, že v médiu buněk byl přítomen 5-FU, uridin i thymidin, nebyla toxicita 5-FU dále zvyšována při přidání CF, což potvrzuje, že se inhibice TS 5-fluorouracilem v přítomnosti thymidinu významně neuplatňuje. Zároveň jsme potvrdili, že stejným způsobem jako uridin snižuje toxicitu 5-FU také cytidin, pravděpodobně poté, co je metabolisován na uridin. Uracil vykazoval významně nižší efekt než uridin. Deoxyuridin a pyridoxin neovlivňovaly toxicitu 5-FU vůbec.

Potvrdili jsme, terapie a prevence PPE 10 % uridinovou mastí lze podpořit *in vitro* důkazy o účinku uridinu jako antidota 5-FU u HaCaT keratinocytů. Tento účinek jsme navíc potvrdili rovněž několika pokusy na primárních keratinocytech. Teoreticky je možné stejným způsobem použít i cytidin, nicméně jeho nižší stabilita (nutnost skladovat v chladu) komplikuje klinické použití. Zároveň lze doporučit uvážit pro případné další klinické testování kombinaci uridinu a thymidinu za účelem zvýšení efektu v terapii PPE.

**Klíčová slova:** Palmární-plantární erythrodysesthesie, Hand-foot syndrome, 5-fluorouracil, uridin, cytidin, thymidin

## **Abstract (thesis):**

Palmar-plantar erythrodysesthesia (PPE) frequently accompanies the therapy with a continuous 5-FU infusion or peroral capecitabine (5-FU prodrug). In the most severe cases this adverse effect leads to discontinuation of a needful therapy. Local 10 % uridine ointment is used to prevent and treat the said adverse event. Nevertheless, this method is not generally accepted as an effective one because it has never been proved in a randomized controlled clinical trial. Most probably, a direct effect of a cytostatic compound on the skin of hands and feet causes PPE. The toxicity of 5-FU is mediated primarily by its incorporation into RNA and by thymidylate synthase (TS) inhibition and subsequent DNA synthesis disruption. The importance of particular 5-FU toxicity mechanisms varies in different cell types. For choosing the best PPE local antidote it is necessary to find out which molecular mechanism applies in keratinocytes.

We have chosen pyrimidine nucleosides as the most suitable compounds for the local PPE therapy because the uridine ointment is already being used in several oncology centers in the Central Europe. In order to find out the 5-FU toxicity mechanism, we further tested the effect of calciumfolinate (CF) which strengthens the TS inhibition by 5-FU. We studied also uracil and pyridoxine as potential 5-FU antidotes. We tested *in vitro* the individual compound potential to prevent toxic 5-FU effects on the HaCaT cell line of spontaneously immortalized human keratinocytes. We used three different and complementary methods of cellular viability testing: microscopical assessment of the evolution of morphological changes documented in microphotographs, metabolic activity assessment by means of the MTT test and measuring the cellular adherence within time by the RTCA test.

We confirmed that uridine significantly prolongs the cellular survival in the 5-FU presence. We also confirmed that cytidine protects the cells to the same extent. Uridine prevents 5-FU incorporation into RNA and thus we confirmed that this mechanism is crucial for the 5-FU toxicity in the HaCaT keratinocytes. When we added thymidine to uridine, further increase in metabolic activity and prolongation of cellular survival occurred. This effect was rather synergic than additive as thymidine solely did not prolong the cellular survival at all. This means that thymidine prolongs cellular survival by abrogating TS inhibition only when the 5-FU incorporation into RNA is blocked by uridine. We confirmed this hypothesis also by

experiments with calciumfolinate (CF). CF increased the 5-FU toxicity only when the 5-FU incorporation into RNA was blocked by uridine. CF did not increase the 5-FU toxicity when no protective compound was added. Therefore uridine “switches” the 5-FU toxicity mechanism from RNA incorporation to TS inhibition which can further be strengthened by CF. When 5-FU, uridine and thymidine were present in the cell culture medium, the 5-FU toxicity was not increased by CF. This confirms the fact that TS inhibition by 5-FU is abrogated by thymidine and therefore CF cannot be effective as a 5-FU toxicity booster. Cytidine showed the same protective effect as uridine probably after its metabolism to uridine. Uracil showed only a significantly lower protective effect in comparison with uridine. Deoxycytidine and pyridoxine did not prevent the 5-FU toxicity at all.

We confirmed that the 10 % uridine ointment application in PPE treatment and prevention can be supported by *in vitro* results of the uridine 5-FU antidotal effect in the HaCaT cells. This effect was further confirmed by several experiments on primary keratinocytes. From the theoretical point of view, cytidine would be similarly effective as uridine when placed into the ointment but the lower stability of this nucleoside (cold storing requirement) makes its clinical employment difficult. The combination of uridine with thymidine for further clinical testing is advisable so that the protective ointment efficacy could be increased.

**Key words:** Palmar-plantar erythrodysesthesia, Hand-foot syndrome, 5-fluorouracil, uridine, cytidine, thymidine

## Obsah

1.	Abecední seznam zkratk	11
2.	Úvod	12
2.1.	Palmární-plantární erythrodysesthesie při terapii fluoropyrimidiny	12
2.1.1.	Patogeneze a projevy palmární-plantární erythrodysesthesie	12
2.1.2.	Metody prevence a terapie palmární-plantární erythrodysesthesie	14
2.2.	Mechanismus cytotoxického působení 5-FU	16
2.3.	Látky modulující účinek 5-FU	18
2.3.1.	Látky zvyšující účinnost 5-FU	18
2.3.2.	Látky snižující toxicitu 5-FU	20
2.4.	10 % uridinová mast jako lokální prostředek v terapii PPE	29
3.	Cíle práce, stanovené hypotézy	31
3.1.	Cíle práce	31
3.2.	Stanovené hypotézy	31
4.	Metody	33
4.1.	Chemikálie	33
4.2.	Kultivace buněk	33
4.2.1.	Kultivace keratinocytů buněčné linie HaCaT	33
4.2.2.	Kultivace primárních keratinocytů	34
4.3.	Měření viability buněk	34
4.3.1.	RTCA test (Real Time Cell Analyser)	34
4.3.2.	MTT test	35
4.3.3.	NTCA (Nondestructive Test of Cellular Activity)	36
5.	Výsledky	37
5.1.	Toxicita 5-FU na buněčnou linii HaCaT	37
5.2.	Toxicita uridinu	40
5.3.	Protektivní účinek uridinu na buňky v přítomnosti 5-FU	43
5.3.1.	Různé koncentrace uridinu + 50 µg/mL (384,6 µM) 5-FU	43
5.3.2.	Minimální protektivní koncentrace uridinu v přítomnosti 5-FU	48
5.3.3.	Toxicita různých koncentrací 5-FU v přítomnosti 50 µg/mL (204,8 µM) uridinu (MTT testy a RTCA testy)	51
5.4.	Toxicita thymidinu	55
5.5.	Protektivní účinek thymidinu na buňky v přítomnosti 5-FU	58
5.5.1.	Minimální protektivní koncentrace thymidinu v přítomnosti 5-FU	58
5.6.	Porovnání protektivního účinku uridinu samotného a thymidinu samotného	61
5.7.	Protektivní efekt kombinace uridinu a thymidinu	64
5.8.	Kalciumfolinát	71

5.9.	Další pyrimidinové nukleosidy (cytidin a deoxycytidin) a jejich kombinace .....	76
5.10.	Protektivní efekt uracilu .....	81
5.11.	Toxicita 5-FU a protektivní efekt uridinu u primárních keratinocytů .....	84
5.12.	Protektivní efekt pyridoxinu .....	91
6.	Diskuse .....	92
6.1.	Toxicita 5-FU .....	93
6.2.	Uridin .....	94
6.3.	Thymidin .....	96
6.4.	Kombinace uridinu a thymidinu .....	98
6.5.	Kalciumfolinát .....	99
6.6.	Další nukleosidy .....	100
6.7.	Další testovaná potenciální antidota .....	101
6.8.	Primární keratinocyty .....	102
7.	Závěr .....	103
8.	Literatura .....	105
9.	Seznam publikací spojených s disertační prací .....	114
10.	Přílohy .....	116

## 1. Abecední seznam zkratk

5-FU: 5-fluorouracil

BAV: biologická dostupnost (bioavailability)

CTP: cytidintrifosfát

DPD: dihydropyridin dehydrogenasa

dCTP: deoxycytidintrifosfát

dTMP: deoxythymidinmonofosfát (thymidylát)

dUTP: deoxyuridintrifosfát

FdU: fluorodeoxyuridin

FdUMP: 5-fluorodeoxyuridinmonofosfát

FTAU: 5-(fenylthio)acyklouridin

MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromidový test

MTX: methotrexát

NTCA: nondestructive test of cellular activity

PPE: palmární-plantární erythrodysesthesie (hand-foot syndrome)

RTCA: real time cell analyser

SDS: laurylsulfát sodný

TS: tymidylát synthasa

TTP: thymidintrifosfát

UDPG: uridindifosfoglukosa

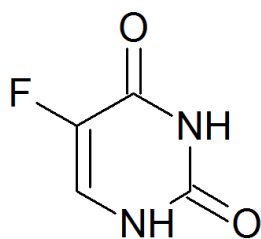
UF: uridin fosforylase

UTP: uridintrifosfát

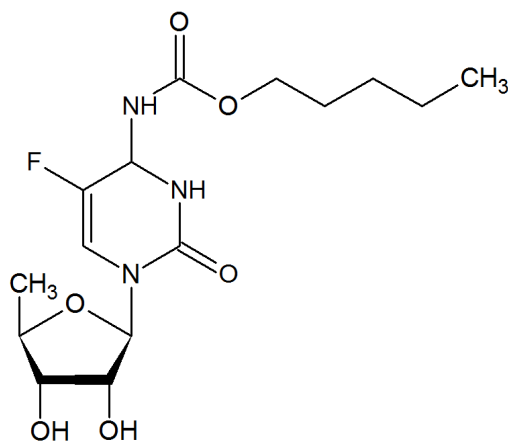
## 2. Úvod

### 2.1. Palmární-plantární erythrodysesthesie při terapii fluoropyrimidiny

5-fluorouracil (5-FU, obr. 1), případně jeho p. o. dostupné proléčivo kapecitabin (obr. 2), patří mezi základní cytostatika používaná v rámci chemoterapeutických režimů především v léčbě kolorektálního karcinomu, ale i dalších nádorů (Engstrom et al. 2009; Longley et al. 2003; Schmoll et al. 2012). Kontinuální podání 5-FU je provázeno menším výskytem nežádoucích účinků, než bolusová aplikace (Lokich et al. 1989), nicméně oproti bolusové aplikaci se při tomto způsobu podání častěji vyskytuje palmární a plantární erythrodysesthesie (PPE, hand-foot syndrome, obr. 3) (Lokich et al. 1989; Wolpin and Mayer 2008). Tento nežádoucí účinek je poměrně častý také v případě dlouhodobé terapie kapecitabinem (Biganzoli et al. 2002; Leonard et al. 2011; Yun et al. 2010), při které se vyskytuje v závislosti na dávce v cca 30-60 % případů (Hofheinz et al. 2012; Leonard et al. 2011). PPE může významně snížit kvalitu života pacientů a v některých případech vede k nutnosti snížení dávky, případně k ukončení jinak účinné antineoplastické terapie (Leonard et al. 2011; SPC\_Xeloda 2006; von Moos et al. 2008; Yun et al. 2010). Hoesly et al. popisují dokonce případ úmrtí v důsledku pseudomonádové sepsy nasedající na závažnou PPE (Hoesly et al. 2011).



Obrázek 1 – 5-fluorouracil



Obrázek 2 – kapecitabin

#### 2.1.1. Patogeneze a projevy palmární-plantární erythrodysesthesie

Na základě klinického obrazu lze PPE rozdělit podle závažnosti do čtyř stupňů od mírné dysesthesie po rozvoj puchýřů a ulcerací (von Moos et al. 2008). Histologický obraz PPE je popisován jako



nespecifická reakce keratinocytů na přítomnost cytotoxické látky (nemusí se jednat pouze o fluoropyrimidiny) v kůži provázená hyperplasií epidermis, předčasnou keratinisací (dyskeratosou) a eosinofilií ve stratum spinosum (Janusch et al. 2006). Rovněž při topické aplikaci 5-FU může vznikat velice podobný klinický obraz, který je většinou připisován alergické reakci (Yentzer et al. 2009).

Důvod distribuce tohoto nežádoucího účinku na dlaně rukou a plosky nohou není zcela objasněn. Predilekční výskyt v těchto oblastech může být způsoben únikem cytostatika z kapilár porušených v oblastech s vyšším mechanickým namáháním, případně vylučováním většího množství cytostatika na povrch kůže v oblastech s velkou hustotou potních žláz a jeho následným cytotoxickým působením na kůži. Martschick et al. považují tlustou vrstvu stratum corneum na dlaních a rukou a vysokou hustotu potních žláz za vlastnosti predisponující kůži dlaní a plosek pro rozvoj PPE (Martschick et al. 2009). Další uváděné mechanismy vzniku PPE jsou lokální zánět vzniklý při overexpressi COX-2 v kůži dlaní a plosek nohou (Lin et al. 2002), případně vyšší výskyt PPE při vyšší aktivitě hlavního enzymu odbourávajícího 5-FU – dihydropyridin dehydrogenasy (DPD), což svědčí pro možnou roli degradačních produktů 5-FU v patogenezi PPE (Yen-Revollo et al. 2008; Zhang et al. 2012).



*Obrázek 3 – palmární-plantární erythrodysesthesie při terapii 5-FU (hand-foot syndrome)*

### **2.1.2. Metody prevence a terapie palmární-plantární erythrodysesthesie**

Studie ukazují, že projevy nežádoucích účinků při terapii kapecitabinem jsou spojeny s vyšší účinností léčby. Vyšší účinnost terapie kapecitabinem při projevech PPE byla potvrzena u metastasujícího kolorektálního karcinomu, lokálně pokročilého karcinomu rekta (Hofheinz et al. 2012) a ve studii s metastasujícím karcinomem prsu (Taguchi et al. 2010). Je otázkou, zda podstatou tohoto jevu je vyšší citlivost buněk pacientů i jejich nádorů na fluoropyrimidiny při projevech PPE, nebo rozdílná farmakokinetika fluoropyrimidinů, vedoucí k vyšší systémové expozici účinné látky u pacientů s rozvojem tohoto nežádoucího účinku. Bylo zjištěno, že při terapii karcinomu prsu a karcinomu kolorekta vede mírné snížení dávky kapecitabinu při projevech toxicity ke snížení závažnosti nežádoucích projevů, aniž by došlo ke snížení účinnosti terapie (Leonard et al. 2011; Yun et al. 2010). Klinické studie fáze II u pacientek s metastatickým karcinomem prsu prokázaly, že po snížení dávky kapecitabinu dochází ke zmírnění nežádoucích účinků. Výsledky léčby po redukci dávky z důvodů projevu nežádoucích účinků byly buď stejné, nebo bylo dosaženo až o více než polovinu vyššího procenta odpovědí na terapii, delšího trvání odpovědi a celkového přežití. Tento výsledek byl potvrzen i ve studii fáze III, ve které měly pacientky léčené kombinací kapecitabin/docetaxel stejný čas do progresu a celkové přežití nehledě na případnou redukci dávky obou léků kvůli nežádoucím účinkům (Leonard et al. 2011). Snížení dávky capecitabinu se tak stalo metodou volby doporučovanou výrobcem přípravku Xeloda® při léčbě PPE (SPC\_Xeloda 2006).

Naopak případné přerušení terapie kapecitabinem, které je v nejzávažnějších případech PPE nutné, je spojeno s horšími léčebnými výsledky adjuvantní terapie po resekci karcinomu tračníku (Yun et al. 2010). V těchto případech, kdy samotné snížení dávky pro snížení toxických projevů nestačí, by bylo výhodné lokální, nebo systémové použití antidota, které ochraňuje zdravé buňky a nesnižuje protinádorovou účinnost fluoropyrimidinů. V současné době však neexistuje takováto universálně doporučená terapie, i když např. uridin tyto požadavky poměrně dobře splňuje (van Groeningen et al. 1992).

V literatuře popsané metody prevence a léčby PPE vyskytující se při terapii fluoropyrimidiny zahrnují kromě snížení dávky:

- Aplikaci 10 % uridinové masti (Juergen 2004; Netikova et al. 2009). Kromě relativně selektivního působení uridinu, který antagonisuje účinek 5-FU více ve zdravých tkáních, než v nádoru (van Groeningen et al. 1992) se zde dosahuje selektivity lokální aplikací. Na základě fyzikálně chemických vlastností uridinu nelze očekávat významnou systémovou absorpci.
- Systémové podání celecoxibu. V klinických studiích byla prokázána účinnost této léčby (Zhang et al. 2012).
- Inhibici dihydropyridin dehydrogenasy (DPD), např. uracilem, nebo eniluracilem (Yen-Revollo et al. 2008). Při podání kombinace tegafur (proléčivo 5-FU) + uracil + leukovorin dochází při stejné účinnosti terapie kolorektálního karcinomu k menší četnosti a závažnosti projevů PPE, než při podání kapecitabinu (Kroep et al. 2015). Podobné výsledky vykazovala i terapie kombinací tegafuru a DPD inhibitoru (kombinace léčiv označovaná jako S-1) u metastatického, či rekurentního karcinomu prsu (Yamamoto et al. 2015). V současné době probíhá studie s 0,1 % uracilovou masť v USA (ClinicalTrials.gov identifikace: NCT01100463) a 1 % uracilová masť je registrována jako patent US 20050215514 A1.
- Aplikaci extraktu z henovníku bílého (*Lawsonia inermis*). Existuje několik kasuistik potvrzujících účinek této léčby (Ilyas et al. 2014; Yucel and Guzin 2008), nicméně vzhledem k malé kvalitě dat (pouze kasuistiky) se tento typ léčby pohybuje za hranicemi medicíny založené na důkazech (EBM).
- V klinické praxi byla testována aplikace emolientních, případně keratolytických mastí. Masť s obsahem kyseliny mléčné a urey v randomisované studii však neprokázala vyšší účinnost v profylaxi PPE, než samotný emolientní krém (Wolf et al. 2010).
- Perorální aplikace pyridoxinu v randomisovaných studiích nevedla ke snížení projevů PPE (Kang et al. 2010; Ota et al. 2014).

## 2.2. Mechanismus cytotoxického působení 5-FU

Úvahy o použití lokálních antidot při léčbě 5-FU vycházejí z možné interference s molekulární podstatou působení 5-FU v buňkách, které spočívá především v následujících dvou hlavních mechanismech:

1. *Inhibice thymidylát synthasy (TS) metabolitem fluorodeoxyuridinmonofosfátem (FdUMP)*. FdUMP se váže na aktivní místo TS a zabraňuje tak vazbě deoxyuridinmonofosfátu (dUMP) a syntéze thymidylátu (dTTP, obr. č. 4). Komplex FdTMP s TS je stabilisován redukovanou kyselinou listovou, která za normálních okolností funguje jako donor methylové skupiny pro přeměnu uracilu na thymin. Následně dochází k dysbalanci mezi koncentracemi jednotlivých nukleotidů a vzniká velké množství dUTP, který se spolu s FdUTP inkorporuje do DNA a způsobuje porušení její funkce (Longley et al. 2003; Martin et al. 1980). Inhibici TS je možné obejít suplementací thymidinu, který je následně metabolisován na thymidylát thymidinkinase (Umeda and Heidelberger 1968). Thymidinkinasa ovšem také aktivuje 5-fluorodeoxyuridin (FdU) na FdUMP a zprostředkovává tak opět inhibici TS.
2. *Inkorporací fluorouridin trifosfátu (FUTP) do RNA*. Inkorporace FUTP do RNA vede k poruše její funkce (Longley et al. 2003; Martin et al. 1980) a je možné ji předejít aplikací uridinu (Codacci-Pisanelli et al. 2008; Sawyer et al. 1984). V klinicky využitelných dávkách je dosahováno při eskalaci dávek významnější inkorporace 5-FU do RNA (Nord et al. 1992).

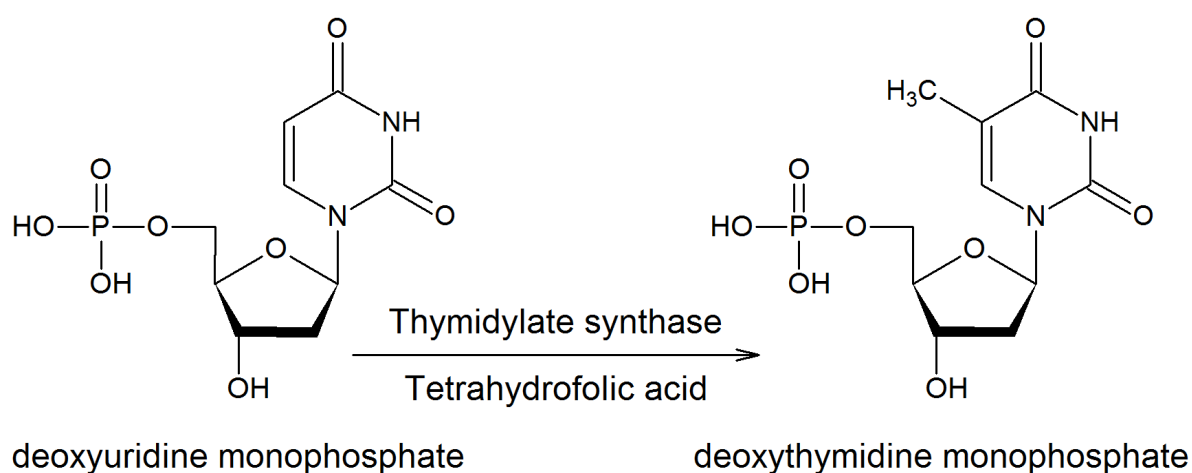
Kromě těchto dvou hlavních mechanismů toxicity jsou popsány další, které však hrají pravděpodobně menší roli při rozvoji toxicity 5-FU:

An et al. považují za důležitý mechanismus účinku rovněž *inkorporaci 5-FU do DNA*. Buňky myších fibroblastů deficientní v uracil-DNA glykosylase *Smug1* (enzym účastnící se opravy DNA při chybném zanesení uridinu), akumulují velké množství 5-FU v DNA a projevuje se u nich významně vyšší toxicita 5-FU. Naopak overexprese *Smug1* vede k resistenci na 5-FU. Pokud na *Smug1* deficientní buňky působil 5-FdU (inhibitor TS), adice thymidinu významně zvýšila jejich přežití. Přestože *Smug1* deficientní buňky byly při přidání thymidinu stále citlivější, na působení 5-FU, než normální buňky, byl tento rozdíl minimální (An et al. 2007). Ve studii sledující expresi *Smug1* u karcinomu prsu bylo naopak zjištěno, že nízká exprese zaznamenána u agresivnějších (triple-negativních a dediferencovaných) nádorů (Abdel-Fatah et al. 2013). Další autoři zjistili, že pro nádorové buňky má větší význam UNG-glykosylasa, než *Smug1*, nicméně zároveň konstatují, že primárním mechanismem

cytotoxicity 5-FU je u těchto buněk RNA toxicita (Pettersen et al. 2011).

5-FU bez vazby na cukernou složku přímo inhibuje některé buněčné enzymy. Jedná se o enzymy opravující DNA (Wurzer et al. 1994), případně další enzymy s dalšími funkcemi (Bagrij et al. 1993).

Někteří autoři popisují také toxicitu způsobenou degradačními produkty 5-FU (Yen-Revollo et al. 2008).



Obrázek 4 – reakce zprostředkovaná thymidylát syntasou. Enzym je inhibován FdUMP, inhibice je zesílena v přítomnosti tetrahydrofolátu.

Různé typy buněk mohou metabolizovat 5-FU na odlišné produkty, takže se u nich mohou rozvíjet různé mechanismy toxicity 5-FU, případně různé mechanismy resistance podle konkrétního enzymatického vybavení (Umeda and Heidelberger 1968; van Groeningen et al. 1992). *In vitro* studie a studie na zvířatech potvrzují zvýšenou účinnost 5-FU v kombinaci s thymidinem, který snižuje význam inhibice TS a zvyšuje inkorporaci FUTP do RNA (Martin et al. 1980). Naopak studie u pacientů s karcinomem kolorekta (Noordhuis et al. 2004; Peters et al. 1994) a žaludku (Lenz et al. 1996) potvrzují význam inhibice TS pro účinnost léčby 5-FU. Vysoká exprese TS koreluje s výskytem resistance nádorů na terapii 5-FU (Kamoshida et al. 2004; Longley et al. 2003). Naproti tomu u nenádorových střevních buněk ukázaly pokusy na myších, že predominantní toxicita 5-FU není spojena s inhibicí TS, neboť suplementace thymidinem nevedla k jejímu snížení. Autoři zároveň potvrdili, že je možné snížit toxicitu 5-FU současným podáním uridinu, který zabraňuje inkorporaci FUTP do RNA (Pritchard et al. 1997). Tento efekt potvrdila i další studie na myších (Bagrij et al. 1993; Codacci-Pisanelli et al. 1997) a studie na lidských a myších buněčných liniích (Codacci-Pisanelli et al. 2008; Sawyer et al. 1984). Ve střední Evropě se v klinické praxi využívá 10 % uridinová mast

k prevenci a léčbě PPE vyvolané fluoropyrimidiny (Juergen 2004; Netikova et al. 2009). Na základě skutečnosti, že zdravé buňky se dělí pomaleji, než buňky nádoru a syntetisují tedy méně DNA lze předpokládat, že budou citlivější na RNA toxicitu, než na DNA toxicitu zprostředkovanou inhibicí TS. Další metodou, jak snížit toxicitu na zdravé buňky je „uridinová rescue“ – tedy systémové podání uridinu několik hodin po terapii fluoropyrimidiny (Codacci-Pisanelli et al. 1997; Hartmann and Bollag 1986; Martin et al. 1982; Nord et al. 1992; Schwartz et al. 1996; van Groeningen et al. 1989). Lze předpokádat, že toxický účinek na rychle metabolisující nádorové buňky se rozvíjí po podání 5-FU dříve a pokud tedy podáme uridin s určitým odstupem od 5-FU, dojde ke snížení toxicity, aniž by byla snížena účinnost (Schwartz et al. 1996).

Farmakokinetika 5-FU je závislá na jeho dávce. Při vyšších dávkách dochází k saturaci enzymů odbourávajících 5-FU a k vyšší AUC. Pokud se tedy např. podáním antidota („uridinová rescue“) umožní eskalace dávek, dochází k výraznějšímu zvýšení expozice, než by odpovídalo poměrům mezi dávkami (Schwartz et al. 1985).

### **2.3.Látky modulující účinek 5-FU**

Byla popsána celá řada látek modulujících účinek 5-FU ať již ve smyslu jeho zvýšení, čehož je nyní běžně využíváno v kombinované léčbě 5-FU a kalciumfolinátem (Advanced\_Colorectal\_Cancer\_Meta-Analysis\_Project 1992), nebo snížení, což může být využito při aplikaci „rescue“ za účelem snížení nežádoucích projevů (Schwartz et al. 1996). Tato druhá možnost byla intensivně zkoumána, nicméně výzkum ustal po zjištění, že 5-FU v kontinuální infuzi je lépe tolerovaný, než při bolusovém podání a nežádoucí účinky se staly méně významným problémem (Lokich et al. 1989). Zcela specifickým teoretickým konceptem „rescue“ terapie je lokální aplikace uridinové masti při léčbě PPE (Juergen 2004; Netikova et al. 2009).

#### **2.3.1. Látky zvyšující účinnost 5-FU**

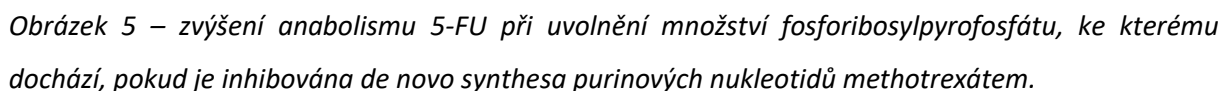
##### ***Kalciumfolinát***

V první řadě se jedná o kalciumfolinát (CF, syn. leukovorin) běžně v klinické praxi aplikovaný spolu

s 5-FU, neboť významně zvyšuje počet odpovědí na léčbu i když neprodlužuje průměrné celkové přežívání pacientů (Advanced\_Colorectal\_Cancer\_Meta-Analysis\_Project 1992). Mechanismus účinku je zprostředkován zesílením vazby FdUMP na TS v přítomnosti tetrahydrofolátu (Longley et al. 2003). V případě studií na buněčných liniích lze odhadnout význam inhibice TS pro účinek 5-FU pomocí přidání kalciumfolinátu. Pokud toxicita není zvýšena, je mechanismem rozvoje toxicity pravděpodobně především inkorporace 5-FU do RNA. Zároveň bylo zjištěno, že tento efekt je pozorovatelný pouze do určité koncentrace 5-FU. Ve vyšších koncentracích 5-FU kalciumfolinát na toxicitu nemá vliv, protože vzhledem k saturaci molekul TS v buňkách není dalším zvýšením afinity FdUMP jejich inhibice zesilována (Codacci-Pisanelli et al. 2008). Účinek 5-FU byl zvýšen přidáním kalciumfolinátu i v pokusech na myších nesoucích lidské nádorové xenografty (Codacci-Pisanelli et al. 1997).

### ***Methotrexát***

Naopak methotrexát (MTX) je falešný metabolit, který inhibuje dihydrofolátreduktasu a zabraňuje tak recyklaci kyseliny listové a synthese purinů a thymidinu. Pokud je podáván v předstihu před 5-FU, zvyšuje jeho účinnost, pravděpodobně zvýšením inkorporace 5-FU do RNA (Longley et al. 2003). Snížením koncentrace tetrahydrofolátu dochází ke snížení afinity FdUTP k TS, nicméně vzhledem k tomu, že MTX nedostatkem tetrahydrofolátu zabrání de novo synthese purinů, dojde následně k elevaci hladin 5-fosforibosyl-1-pyrofosfátu, který je klíčovým substrátem pro fosforibosyltransferasu, enzym syntetisující 5-fluorouridinmonofosfát. Dojde tedy ke zvýšenému anabolismu 5-FU (obr. 5) (Martin et al. 1980). Kombinace 5-FU s MTX je využíváno např. při terapii karcinomu prsu léčebným režimem CMF (cyklofosfamid, methotrexát, 5-fluorouracil) (Goldhirsch et al. 1998).



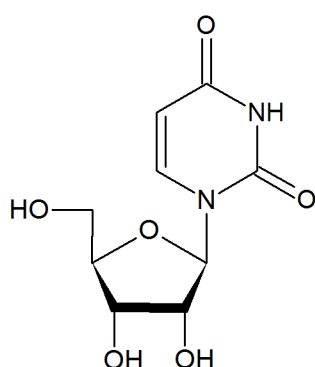
Další možností, jak dosáhnout zvýšení účinnosti 5-FU, je kombinace s cytokiny. Jako příklad lze uvést TNF  $\alpha$  a INF  $\alpha$  (Oka et al. 1997). *Interferon  $\alpha$*  zvyšuje koncentraci aktivních metabolitů 5-FU a snižuje overexpresi TS spojenou s podáním 5-FU (Kreuser et al. 1995), nicméně jeho podání nevede k lepším výsledkům léčby *in vivo* a naopak zvyšuje její toxicitu. Kombinace INF  $\alpha$  a 5-FU z tohoto důvodu nenašla klinické uplatnění (Kornmann et al. 2010). TNF  $\alpha$  zvyšuje expresi uridin fosforylasy, enzymu aktivujícího 5-FU (Wan et al. 2006), klinicky se však tato kombinace v současné době nevyužívá. Naproti tomu byly v pokusech na myších úspěšně použity látky inhibující uridin fosforylasu za účelem snížení toxicity terapie (Al Safarjalani et al. 2012; Al Safarjalani et al. 2006).

Řadíme na toto místo především některé pyrimidinové nukleosidy, které jsme zkoumali v rámci naší práce. Dále jsou uvedeny inhibitory uridin fosforylasy, celekoxib a další látky, které mají okrajový význam, neboť neprokázaly významný klinický efekt a nenašly v klinické praxi širší uplatnění (pyridoxin, inhibitory DPD, allopurinol, ...).



## Uridin

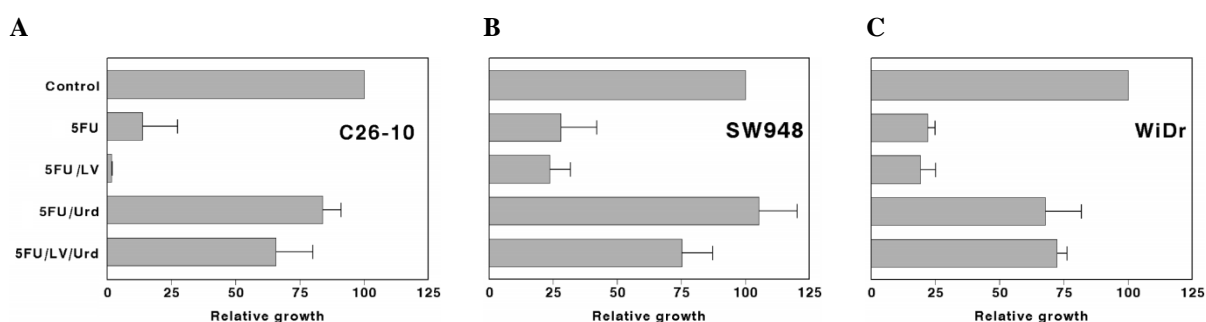
### Uridin – preklinická data



Obrázek 6 – uridin

Codacci-Pisanelli et al. prokázali na několika buněčných liniích karcinomu tračníku, že uridin (obr. 6) zabraňuje inkorporaci 5-FU do RNA a snižuje tak jeho toxicitu u buněk, které jsou citlivé na tento mechanismus účinku. Po přidání uridinu došlo u těchto buněčných linií k obnově proliferační aktivity a tento účinek byl v některých případech snížen po přidání kalciumfolinátu, který opětovně zvyšoval toxicitu 5-FU a to i v přítomnosti uridinu (poklesy proliferační aktivity v přítomnosti CF byly malé, ale patrné). Na základě této studie lze rozdělit buněčné linie podle efektu CF a uridinu na 3 skupiny (viz graf 1).

Skupinu buněčných linií podobných C26-10 (myší karcinom tračníku), které reagují na CF zvýšením toxicity jak v přítomnosti uridinu, tak bez uridinu. Bez přítomnosti uridinu jsou projevy toxicity 5-FU výraznější (graf 1A). Skupinu podobnou SW948 (lidský karcinom tračníku), ve které buňky reagují zvýšenou toxicitou 5-FU v přítomnosti CF pouze pokud je v médiu také uridin. Zdá se, že u těchto buněk dojde ke zvýšení významu inhibice TS po přidání uridinu (graf 1B). A skupinu buněčných linií podobnou WiDr (lidský karcinom tračníku), což jsou buňky, které nereagují na přidání CF ani bez uridinu, ani v přítomnosti uridinu a inhibice TS tedy u těchto buněk nehraje žádnou roli (graf 1C).



Graf 1 – účinek 5-FU (5-FU), 5-FU + CF (5-FU/LV), 5-FU + uridin (5-FU/Urd) a 5-FU + CF + uridin (5-FU/LV/Urd) na 3 různé buněčné linie. Měřeno jako míra inhibice růstu oproti kontrolním buňkám. V případě linie C26-10 byla použita koncentrace 1  $\mu$ M 5-FU a v případě linií SW948 a WiDr byla použita koncentrace 5  $\mu$ M 5-FU. Převzato z (Codacci-Pisanelli et al. 2008).

V těchto experimentech byly buňky exponovány 5-FU po 24 hodin a následně byl přidán uridin na 48

hodin (Codacci-Pisanelli et al. 2008).

U myši je možné při parenterálním podání proléčiva uridinu (uridindifosfoglukosy, UDPG) po aplikaci 5-FU s kalciumfolinátem zvýšit dávku 5-FU na 150 %, aniž by byla zaznamenána vyšší toxicita měřená jako rozdíl ve váhovém úbytku zvířat. Byla zaznamenána srovnatelná míra hematotoxicity v případě aplikace 100 % dávky 5-FU a 150 % 5-FU + UDPG (v obou případech došlo ke snížení hematokritu) (Codacci-Pisanelli et al. 1997). Terapeutický index 5-FU byl zvýšen u myši i při použití dalšího prekursoru uridinu, který je možno aplikovat perorálně – uridintriacetátu (Kelsen et al. 1997).

Dále byl studován *in vivo* účinek UDPG podané 2 hodiny po 5-FU na intestinální toxicitu 5-FU u myši. U intestinálních buněk zvířat, kterým byla aplikována UDPG nebyl prokázán rozdíl v obsahu proteinů, poklesu aktivity thymidin kinasy (marker buněčné proliferace), sacharasy a maltasy oproti zvířatům, která dostávala pouze 5-FU. Po podání UDPG však došlo k rychlejší obnově buněčných funkcí, což naznačuje predominantní toxicitu 5-FU na RNA u zdravých střevních buněk, která byla po iniciační dávce 5-FU snížena podáváním UDPG (Codacci-Pisanelli et al. 1997).

Při navýšení dávky s prevencí toxicity pomocí parenterální aplikace UDPG dvě hodiny po aplikaci 5-FU bylo dosaženo silnější protinádorové účinnosti u myši nesoucích původně 5-FU resistantní lidské xenografty (Codacci-Pisanelli et al. 1997). Při tomto časovém odstupu však byla popsána nižší účinnost terapie 5-FU, v klinické praxi. Při léčbě pacientů je tedy třeba dodržovat při aplikaci „uridinové rescue“ delší odstup (Schwartz et al. 1996). Účinnost 5-FU byla dále zvýšena přidáním kalciumfolinátu, což podporuje předpoklad, že toxicita 5-FU na nádorové buňky je důsledkem inhibice TS, která není uridinem preventována (Codacci-Pisanelli et al. 1997). Podobné výsledky byly potvrzeny i v další studii na myších, kterým byla aplikována „opožděná uridinová rescue“ po terapii 5-FU a došlo ke snížení toxicity léčby 5-FU (Martin et al. 1982) a v další studii na myších a krysách (Hartmann and Bollag 1986). Zvýšená dávka 5-FU při prevenci toxicity uridinem s odstupem několika hodin však vedla na myších modelech také k vyšší inkorporaci 5-FU do RNA nádoru. To dokazuje, že rychle metabolisující nádorové buňky zabudovaly 5-FU do RNA rychleji, než byla aplikována „uridinová rescue“ a došlo tak k selektivnímu snížení toxicity u zdravých tkání (Nord et al. 1992).

## Uridin – klinická data

V klinických studiích byl uridin dobře tolerován, pokud byl podán v jednorázové infuzi, nicméně vlivem krátkého poločasu (118 min) došlo k nedostatečné expozici a nebyl prokázán efekt na snížení toxicity podávaného 5-FU (Leyva et al. 1984). Kvůli vzestupu tělesné teploty nelze uridin podávat

v kontinuální infuzi. Za účelem parenterální „uridinové rescue“ při terapii 5-FU byl tedy vytvořen režim tříhodinových infusí, které jsou následovány tříhodinovými pausami. Tento režim je dobře tolerován (dochází pouze k mírnému vzestupu tělesné teploty o  $< 1^{\circ}\text{C}$ ) a prokázal účinnost při snížení výskytu leukopenie. Dalším nepříjemným nežádoucím účinkem uridinu je flebitida při podání do periferní žíly. Je tedy nutné zavedení centrálního žilního přístupu (van Groeningen et al. 1986). Plasmatické koncentrace uridinu při intermitentním podávání dosahovaly hodnot cca mezi 521-987  $\mu\text{M}$  na konci tříhodinové infuze a 138-811  $\mu\text{M}$  na konci tříhodinové pauzy (van Groeningen et al. 1989). Při použití 6 g uridintriacetátu ve formě tablet p. o. á 6 hodiny bylo dosaženo hladin uridinu mezi 67-201  $\mu\text{mol/L}$  s průměrnou steady state koncentrací 127  $\mu\text{mol/L}$ . Hladiny uridinu vyšší, než 50  $\mu\text{mol/L}$  jsou pro snížení projevů hematotoxicity klíčové (Kelsen et al. 1997).

U pěti pacientů došlo k úpravě leukopenie vyvolané podáním 5-FU v krátké infuzi 1x týdně při i. v. podání uridinu formou třídenní intermitentní infuze popsané výše. Infuze byla zahájena 3 hodiny po podání 5-FU. Je zajímavé, že přestože byl uridin podán pouze v rámci jednoho týdenního cyklu způsobil vzestup počtu leukocytů, který trval při nepřerušené aplikaci 5-FU 1x týdně po dobu následujících 4-5 týdnů. Autoři uvádějí jako možné zdůvodnění vytvoření tkáňových zásob uridinu. Účinnost antineoplastické terapie nebyla zkoumána (van Groeningen et al. 1989). Schwartz et al. zaznamenali dramatické snížení účinku terapie u pacientů, kterým byl uridin podán 2 hodiny po bolusu 5-FU. Této ztrátě účinnosti 5-FU bylo zabráněno při zachování protektivního účinku uridinu na zdravé tkáně, pokud byla uridinová terapie podána až 24 hodin po podání 5-FU (Schwartz et al. 1996). V případě 5-FU vyvolané trombocytopenie u čtyř významně předléčených pacientů uridin účinný nebyl. Pacienti s trombocytopenií nevykazovali vzestup ani v bílé krevní řadě. (van Groeningen et al. 1989).

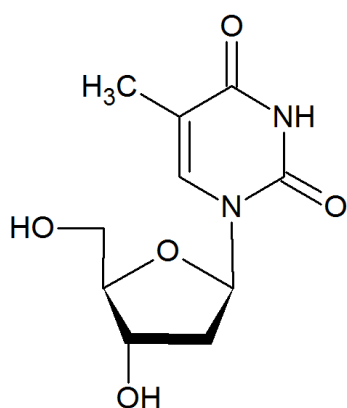
Podobných výsledků bylo dosaženo i při p. o. aplikaci uridinu. Problémem této aplikační cesty je nízká p. o. biodostupnost (BAV), která činí pouze 5,8-9,9 %. Maximální jednotlivá tolerovaná dávka je 10-12  $\text{g/m}^2$ . Při této dávce je dosaženo plasmatických hladin 60-80  $\mu\text{M}$ . Maximální tolerovaná dávka při opakovaném podání á 6 hodin je 5  $\text{g/m}^2$  a je při ní dosaženo steady state koncentrací kolem 50  $\mu\text{M}$  (van Groeningen et al. 1991). U pěti pacientů s rozvojem leukopenie po vysokých bolusových dávkách 5-FU uridinová p. o. „rescue“ terapie upravila hladiny leukocytů. U dalších dvou pacientů, u kterých byla pro podání vysokých dávek 5-FU limitující trombocytopenie nebyl uridin účinný. U 5 ze 7 pacientů se po p. o. podání uridinu rozvinul mírný průjem (van Groeningen et al. 1993). Zvýšení maximální tolerované dávky 5-FU při terapii p. o. uridinem potvrzuje i další studie (Schwartz et al. 1996). Výskyt průjmů a nutnost podávání vysokých dávek lze obejít podáním uridintriacetátu (6 g á 6 hodin), který vlivem vyšší lipofility dosahuje vyšší p. o. BAV a výrazné průjmy nezpůsobuje. V klinické studii s 5-FU a p. o. proléčivem uridinu triacetyluridinem nebyla u 38 pacientů zaznamenána

GIT toxicita (Kelsen et al. 1997).

Přes tyto slibné počáteční výsledky se další výzkum „uridinové rescue“ zastavil v době, kdy byl vyvinut postup kontinuálního podání 5-FU, při kterém dochází k nižšímu výskytu hematotoxicity. Při tomto podání se nicméně do popředí se dostává jiný nežádoucí účinek – PPE (Lokich et al. 1989). Nabízí se tedy použít ke zmírnění těchto projevů „lokální uridinovou rescue“ 10 % uridinovou mastí (Juergen 2004; Netikova et al. 2009). Tato terapie se ukázala jako bezpečná, v souboru 84 pacientů byla zaznamenána pouze jedna alergická reakce (atypické malé papulky) u pacienta s alergickou anamnesou (Netikova et al. 2009). Efektivita však dosud nebyla potvrzena metodou randomisované placebem kontrolované klinické studie.

Další větví výzkumu tohoto přístupu je studium kombinace uridinu a inhibitorů uridin fosforylasy, která prokazuje dobré výsledky u myší nesoucích lidské xenografty (viz dále).

### **Thymidin**



Obrázek 7 – thymidin

Z popsaných mechanismů účinku 5-FU vyplývá, že přinejmenším u některých typů buněk s toxicitou predominantně způsobovanou inhibicí TS by mělo být možné snížit toxicitu 5-FU podáním thymidinu (obr. 7). Studie na některých buněčných liniích (Umeda and Heidelberger 1968), krysách a myších (Hartmann and Bollag 1986) toto potvrzují a bylo také potvrzeno, že thymidin zabraňuje toxickému účinku selektivního inhibitoru TS tomudexu na myší intestinální buňky *in vivo* (Pritchard et al. 1997).

### **Zvýšení účinnosti 5-FU thymidinem**

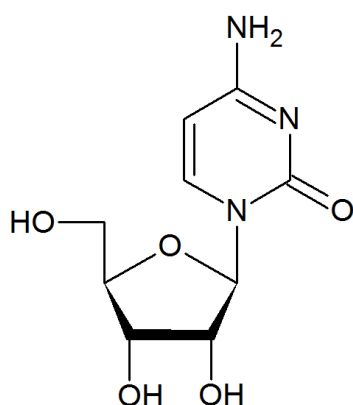
Thymidin může u některých typů buněk zesilovat účinnost 5-FU zvýšením jeho inkorporace do RNA, což bylo prokázáno na modelech myších solidních nádorů a leukemie (Martin et al. 1980; O'Dwyer et al. 1987; Osswald and Youssef 1979). Vyšší účinnost a toxicita byla také zaznamenána v klinických studiích při podávání 5-FU a thymidinu dohromady (Martin et al. 1980). Přestože pro 5-FU ve formě kontinuální infuze je většinou limitující GIT toxicita, pokud byla zároveň s 5-FU (5-20 mg/kg/den, 5 dní) podávána kontinuální infuze thymidinu (8 g/m<sup>2</sup>/den) stala se limitujícím faktorem

hematotoxicita (Vogel et al. 1979). To je v rozporu s výsledky pokusů na lidských hematopoetických buňkách, které získaly resistenci k 5-FU po transfekci genem pro pozměněnou TS, což svědčí pro významnou roli inhibice TS u buněk bez této transfekce (Bielas et al. 2009). Rozpory v těchto studiích dokazují variabilitu mechanismů účinku 5-FU v různých buněčných liniích. V klinických studiích fáze I byl zaznamenán prodloužený poločas ( $T_{1/2}$ ) 5-FU vlivem jeho sníženého katabolismu v případě, že byl podán společně s thymidinem. Následkem toho došlo ke zvýšení plochy pod křivkou plasmatických koncentrací (AUC) 5-FU, která koreluje s účinností 5-FU. Mírně vyšší účinnost (parciální odpověď u malého počtu pacientů předléčených samotným 5-FU) i vyšší toxicita 5-FU tedy může vyplývat také z farmakokinetických interakcí 5-FU s thymidinem, aniž by došlo ke změně farmakodynamiky 5-FU v přítomnosti thymidinu (Martin et al. 1980; O'Dwyer et al. 1987).

### Vlastní toxicita thymidinu

Thymidin vykazuje vlastní toxicitu, která se projevuje v koncentracích od 62  $\mu$ M do 10 mM v závislosti na typu zkoumaných buněk (O'Dwyer et al. 1987). Mechanismus rozvoje toxicity spočívá především v alosterické inhibici ribonukleotid reduktasy nadměrným množstvím thymidintrifosfátu (TTP). Vzhledem k tomu, že ribonukleotid reduktasa metabolisuje přeměnu všech nukleotidů na deoxyribonukleotidy, vede její inhibice k depleci deoxycytrinifosfátu (dCTP) a poruše rovnováhy mezi TTP a dCTP. To následně způsobuje porušení syntézy DNA. Tomuto účinku thymidinu je možné zabránit u některých buněčných linií suplementací deoxycytidinu (Fox et al. 1980; Martin et al. 1980), nicméně u jiných buněčných linií deoxycytidin účinný není (Akman et al. 1981; Hartinger et al. 2015). Kromě inhibice ribonukleotid reduktasy dochází při vysokých koncentracích thymidintrifosfátu ke zpětnovazebnému snížení aktivity celé řady dalších enzymů ať již v rámci „salvage pathway“, tak v rámci de novo syntézy nukleotidů (Martin et al. 1980). Bylo také prokázáno, že při aplikaci nízké koncentrace exogenního deoxycytidinu nedochází k nárůstu zásob dCTP v buňce a přesto dochází ke snížení toxicity thymidinu (Fox et al. 1980), což ukazuje na přítomnost dalšího mechanismu účinku, kterým deoxycytidin snižuje toxicitu thymidinu. V minulosti byl thymidin zkoušen v klinických studiích jako antineoplastický lék. Celkem byl podán jako monoterapie 29 pacientům s akutní leukémií, z nichž u jednoho bylo dosaženo kompletní remise. Terapie byla vlivem nízké rozpustnosti thymidinu zatížena nutností aplikace velkého množství tekutin a následně bylo od klinických zkoušek upuštěno (Martin et al. 1980; O'Dwyer et al. 1987). Vlivem porušené syntézy DNA zastavuje thymidin dělení buněk a tohoto účinku je využíváno *in vitro* k synchronisaci buněčného cyklu v S-fázi (Xeros 1962).

## Cytidin

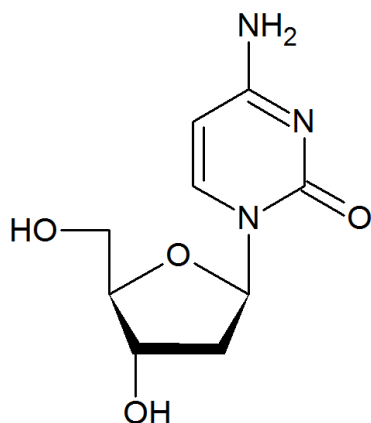


Obrázek 8 – cytidin

Vliv cytidinu (obr. 8) na toxicitu 5-FU je málo prostudovaný. Je popsána studie na buněčných liniích čínského křečka, která potvrzuje, že vyšší hladiny cytidintrifosfátu (CTP) jsou spojeny s resistencí na 5-FU (Kaufman 1984). Naopak přidání cytidinu, nebo guanosinu k 5-FU zvyšovalo účinnost léčby sarkomu u myši (Osswald and Youssef 1979). Na buněčné linii kolorektálního karcinomu (WiDr) nezabránil krátkodobě aplikovaný cytidin inkorporaci 5-FU do RNA (na rozdíl od uridinu) (van Groeningen et al. 1992).

Pokud by byl protektivní efekt (Kaufman 1984) potvrzen při systémovém podání cytidinu, činí z něj možnou alternativu pro „rescue“ terapii snižující toxicitu 5-FU. Studie na králících naznačují, že jeho výhodou oproti uridinu může být skutečnost, že nevyvolává zvýšení tělesné teploty (Peters et al. 1987). Pro případné lokální podání cytidinu jako antidota při léčbě 5-FU však tento fakt nehraje roli.

## Deoxycytidin



Obrázek 9 – deoxycytidin

Údaje o případném podávání deoxycytidinu (obr. 9) za účelem protektivního působení při expozici 5-FU v literatuře chybí. Samotný deoxycytidin není pro buňky toxický (Akman et al. 1981).

### Kombinace nukleosidů

Martin et al. studovali účinek 5-FU v kombinaci s thymidinem s/bez přidání uridinu na myších s karcinomem prsní žlázy. Došlo k výraznému snížení mortality ve skupině s uridinem, které bylo zprostředkováno především snížením toxicity léčby. Zároveň došlo k mírnému snížení účinnosti, nicméně terapeutický index 5-FU se ve výsledku zvýšil (Martin et al. 1980).

Deoxycytidin snižoval toxicitu thymidinu u buněčné linie HL-60 odvozené od lidské akutní granulocytární leukemie, která vykazovala vysokou míru resistance na inhibici buněčného dělení

thymidinem. Tato inhibice byla závislá na dávce, projevovala se až při koncentraci 1,0 mM thymidinu a 90 % dosahovala v koncentraci 5,0 mM. V této koncentraci nedocházelo k přímé toxicitě thymidinu, nicméně při koncentraci 10,0 mM došlo k projevům cytotoxicity a snižovala se viabilita buněk. U zdravých hematopoetických buněk se projevovala toxicita thymidinu ve výrazně nižších koncentracích, nešlo jí předejít přidáním deocxytidinu a nebyla reversibilní (Akman et al. 1981).

### ***Inhibitory uridin fosforylasy***

Inhibitory uridin fosforylasy (UF) významně prodlužují plasmatický poločas uridinu a tím zvyšují jeho účinnost v prevenci toxicity vzniklé po podání 5-FU. Navíc snížením katabolismu uridinu mohou snižovat nežádoucí projevy uridinové terapie (Al Safarjalani et al. 2012) vyvolávané degradačními produkty uridinu (Peters et al. 1987). Na myších s lidskými xenografty nádoru prsu byl za účelem snížení toxicity 5-FU terapie studován efekt silného a specifického inhibitoru uridin fosforylasy 5-(fenylthio)acyklouridinu (FTAU) a uridinu, případně kombinace obou těchto látek. Protektivní látky byly podávány p. o. 2 hodiny po podání 5-FU. FTAU vykazuje díky dostatečné lipofilitě 100 % p. o. BAV a významnou penetraci do tkání, kde může inhibovat UF. Při podání letální dávky 5-FU (200 mg/kg) uridin nesnížil toxicitu terapie a všechna zvířata uhynula do 38 dní. FTAU mírně snížil toxicitu (přežilo 38 % zvířat), nicméně účinnost léčby nebyla zvýšena. Při aplikaci FTAU a uridinu dohromady přežila všechna zvířata a došlo k redukci velikosti nádoru o 97 %, zatímco v případě terapie maximální tolerovanou dávkou 5-FU bez protektivních látek (50 mg/kg) došlo k redukci pouze o 61 %. Při následném zvýšení dávky 5-FU na 300 mg/kg přežilo při protektivní terapii FTAU + uridin 67 % zvířat a došlo ke 100 % redukci velikosti nádoru. Účinky terapie byly stejné u dvou různých typů xenograftů s rozdílnou expresí estrogenových receptorů (Al Safarjalani et al. 2012). Velmi podobných výsledků bylo dosaženo při testování účinnosti kombinace FTAU + uridin na xenograftech lidského nádoru tračníku i když v žádném nebylo dosaženo 100 % redukce velikosti nádoru. Nebyl zaznamenán rozdíl mezi účinkem u dvou typů xenograftů s rozdílnou aktivitou UF. Zároveň bylo prokázáno, že prodloužení intervalu mezi aplikací 5-FU a antidot na 4 hodiny vede ke snížení jejich účinnosti (Al Safarjalani et al. 2006). Při interpretaci těchto výsledků je však třeba mít na paměti, že v klinických studiích uridin podaný dvě hodiny po 5-FU snižoval účinnost terapie, na rozdíl od podání 24 hodin po 5-FU (Schwartz et al. 1996). Autoři mimo jiné navrhují kombinaci FTAU + uridin jako antidotum při případném předávkování 5-FU (Al Safarjalani et al. 2012; Al Safarjalani et al. 2006).

Inhibice UF snižuje odbourávání uridinu v játrech a je tedy vhodným způsobem zpomalení rychlé clearance systémového uridinu (Al Safarjalani et al. 2012). Pro lokální terapii PPE se tento postup jeví

méně výhodným, neboť v masti dodáváme uridin v nadbytku a nedochází zde k jaternímu first-pass efektu.

### ***Celecoxib***

Podání celecoxibu (200 mg p. o.) pacientům užívajícím kapecitabin snižovalo výskyt PPE v randomisované studii. Došlo k redukci výskytu PPE 1. stupně o 17,2 % (ze 74,6 % na 57,4 %) a PPE 2. stupně o 14,9 % (z 29,6 % na 14,7 %) (Zhang et al. 2012). Dřívější retrospektivní studie popisuje kromě snížení výskytu PPE také snížení průjmů po kapecitabinu a zlepšení výsledků terapie, pokud pacienti užívali celecoxib (Lin et al. 2002).

### ***Inhibitory dihydropyridin dehydrogenasy***

Dále bylo paradoxně zjištěno, že látky, které zabraňují odbourávání 5-FU dihydropyridin dehydrogenasou (např. uracil a eniluracil) snižují jeho toxicitu (Longley et al. 2003; Yen-Revollo et al. 2008). Toto však nebylo prokázáno *in vitro* na lidských keratinocytech (buněčná linie HaCaT) (Boukamp et al. 1988).

### ***Pyridoxin***

V klinických studiích byla ověřována účinnost p. o. podávaného pyridoxinu na prevenci PPE. Účinek pyridoxinu se neprokázal (Kang et al. 2010; Ota et al. 2014).

### ***Alopurinol***

Existuje i studie, která prokazuje sníženou toxicitu bolusového 5-FU při předléčení alopurinolem, nicméně tato studie se nezabývala PPE (Schwartz et al. 1985).



### ***Nespecifické dermatologické přípravky.***

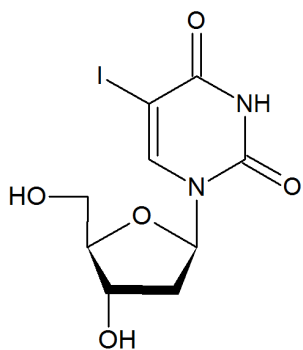
Lokální aplikace kyseliny mléčné a urey neprokázala efektivitu v prevenci rozvoje PPE. Výsledky nebyly lepší, než použití nespecifického emolientního krému (Wolf et al. 2010). V případě klinického hodnocení účinku lokálních antidot ve formě mastí včetně uridinové masti je nutné vždy vyloučit v placebové větvi účinek mastového základu, který může snižovat projevy PPE sám o sobě.

#### **2.4.10 % uridinová mast jako lokální prostředek v terapii PPE**

Pro velikost dávky uridinu při i. v. podání je limitující rozvoj nežádoucích účinků, především horečky (Peters et al. 1987; van Groeningen et al. 1986; van Groeningen et al. 1992), která je vyvolána pravděpodobně degradačními produkty uridinu (Peters et al. 1987) a může být preventována podáním inhibitorů uridin fosforylasy (UF) (Al Safarjalani et al. 2012). Další komplikací vyžadující centrální cévní přístup je rozvoj flebitidy při aplikaci do periferní žíly (van Groeningen et al. 1986). Při terapii lokálního nežádoucího účinku, jakým je PPE, se však jeví lokální topická aplikace uridinu (Juergen 2004; Netikova et al. 2009) jako velmi výhodná, protože nevyvolává systémové nežádoucí účinky a zároveň zachovává při dostatečné compliance dlouhodobou expozici buněk uridinu, která je pro jeho protektivní účinek klíčová (Leyva et al. 1984). Co se týče lokálních nežádoucích účinků, došlo u jednoho z 84 pacientů, který měl alergickou anamnesu k rozvoji atypických malých bílých kožních papul (Netikova et al. 2009).

Teoretické vysvětlení účinnosti terapie PPE uridinovou mastí, která je empiricky používána ve Střední Evropě (Juergen 2004; Netikova et al. 2009), předpokládá toxické působení 5-FU na kůži plosk nohou a dlaní rukou. Aplikace lokálního antidota snižujícího toxicitu 5-FU ve formě masti se tak jeví jako vhodný způsob, jak PPE léčit bez ohrožení systémového účinku chemoterapie. Zároveň lze s výhodou využít rozdílného mechanismu toxicity u různých typů buněk. Podle publikovaných studií se zdá, že pro nádorové buňky (Kamoshida et al. 2004; Lenz et al. 1996; Noordhuis et al. 2004; Peters et al. 1994) a pro buňky kostní dřeně (Bielas et al. 2009) je důležitým mechanismem toxicity 5-FU především inhibice TS, naopak pro buňky střevní sliznice je důležitá inkorporace 5-FU do RNA (Bagrij et al. 1993; Pritchard et al. 1997). Na myších s lidskými nádorovými xenografty, kterým byl podáván 5-FU samotný, nebo v kombinaci s p. o. aplikací UDPG nebyla na jednom typu xenograftu (Colon 38) zaznamenána snížená účinnost 5-FU proti nádoru a na druhém typu (Colon 26-10) bylo dosaženo mírného snížení účinku při intenzivnější terapii UDPG (Codacci-Pisanelli et al. 1997). Je tedy otázkou,

zda je možné uridin, případně jeho prekursory bezpečně použít v klinické praxi a případně jaké by mohly být markery zjistitelné v buňkách nádoru, které by predikovaly, zda systémové podání prekursorů uridinu neohrozí účinnost chemoterapie. Jednou z možností jak toto zjistit by mohlo být *in vitro* testování buněk z resekátu po chirurgickém odstranění nádoru pomocí MTT testů, které prokazuje dobrou korelaci s klinickou účinností léčby (Hajduch et al. 1996). Tímto způsobem by šlo odhadnout citlivost nádoru na uridinovou rescue.



Obrázek 10 – idoxuridin

Na základě fyzikálně-chemických vlastností uridinu lze předpokládat, že risiko systémového účinku topicky aplikovaného uridinu ve formě masti při terapii PPE je minimální. V literatuře sice chybí informace o transdermálním vstřebání uridinu, nicméně relativně podobná sloučenina – 5-iododeoxyuridin (syn. idoxuridin, obr. 10) – se v pokusech na myších po topické aplikaci nevstřebával. Při extrapolaci těchto výsledků na uridin je vhodné si uvědomit, že iod zvyšuje lipofilitu molekuly. Vyšší hodnota  $\log P$  ( $\log P_{\text{octanol/voda}}$  pro idoxuridin = -0,7) se oproti uridinu posouvá směrem k rozmezí, které je vhodné pro transdermální absorpci ( $\log P_{\text{octanol/voda}}$  mezi 1 a 3 (Benson 2005)). Uridin, který má  $\log P_{\text{octanol/voda}}$  = -1,98, by se tedy měl vstřebávat ještě méně ochotně, než idoxuridin.

### 3. Cíle práce, stanovené hypotesy

#### 3.1.Cíle práce

Cílem práce bylo *in vitro* stanovit citlivost keratinocytů k 5-FU a protektivní účinek uridinu, případně dalších nukleosidových a nenukleosidových protektivních agens. Kromě pyrimidinů (uridin, thymidin, cytidin a deoxycytidin) a uracilu, který podle jedné studie snižoval výskyt PPE po podání proléčiva 5-FU tegafuru (Kroep et al. 2015), byl testován rovněž pyridoxin, který byl v klinických studiích zkoušen jako lék na PPE (Kang et al. 2010; Ota et al. 2014). Výsledky mají potvrdit, nebo vyvrátit oprávněnost klinického použití 10 % uridinové masti (Juergen 2004; Netikova et al. 2009), neboť v současné době nelze vyloučit při absenci randomisovaných klinických studií, že za případným pozitivním účinkem stojí placebo efekt, případně efekt masťového základu. Pro doplnění preklinických informací k tomuto způsobu léčby jsme testovali lidské keratinocyty buněčné linie HaCaT a primární keratinocyty na citlivost k 5-FU a protektivní účinek výše zmíněných látek.

Vzhledem k variabilitě v molekulárním mechanismu toxického působení 5-FU u různých typů buněk (Codacci-Pisanelli et al. 2008; Umeda and Heidelberger 1968; van Groeningen et al. 1992) bylo dalším cílem zjištění mechanismu účinku 5-FU u lidských keratinocytů za účelem případného racionálního zdokonalení formulace masti pro terapii a prevenci PPE. V literatuře jsou popsány 2 hlavní mechanismy 5-FU toxicity: inkorporace do RNA a inhibice TS (Longley et al. 2003; Martin et al. 1980). Za účelem zjištění významu těchto jednotlivých mechanismů toxicity byly úspěšně použity látky modulující efekt 5-FU (Codacci-Pisanelli et al. 2008; Umeda and Heidelberger 1968). Pokud se toxicita sníží po přidání uridinu, hraje významnou roli inkorporace 5-FU do RNA (Codacci-Pisanelli et al. 2008). Byl zjišťován rovněž vliv kalciumfolinátu, který zesiluje inhibici TS (Advanced\_Colorectal\_Cancer\_Meta-Analysis\_Project 1992; Codacci-Pisanelli et al. 1997; Longley et al. 2003). Naopak přidání thymidinu význam inhibice TS významně snižuje (Hartmann and Bollag 1986; Pritchard et al. 1997; Umeda and Heidelberger 1968). Deoxycytidin podle publikovaných studií významně snižuje případnou toxicitu thymidinu (Fox et al. 1980; Martin et al. 1980).

#### 3.2.Stanovené hypotesy

1. *hypotese*: uridin snižuje *in vitro* toxicitu 5-FU, což potvrzuje potenciál uridinové masti v prevenci a léčbě PPE. Zároveň by v takovém případě byl potvrzen významný vliv inkorporace 5-FU do RNA, která je uridinem antagonisována.

2. *hypotesa*: pokud kalciumfolinát zvyšuje toxicitu 5-FU, hraje významnou roli v molekulárním mechanismu působení 5-FU inhibice TS.
3. *hypotesa*: případné snížení toxicity 5-FU po přidání thymidinu svědčí rovněž pro významnou roli inhibice TS v rozvoji toxicity 5-FU.
4. *hypotesa*: pokud uridin prodlouží přežívání buněk a zvýší citlivost buněk na kalciumfolinát dochází zde ke změně mechanismu toxicity 5-FU z inkorporace do RNA na inhibici TS. Efekt kalciumfolinátu by v takovém případě měl zmizet po přidání thymidinu do média. Buňky by pak reagovaly podobně jako buňky lidského karcinomu tračníku SW948 ve studii Codacci-Pisanelliho et al (Codacci-Pisanelli et al. 2008).
5. *hypotesa*: uracil snižuje toxicitu 5-FU, neboť jako inhibitor DPD snižoval podle literárních údajů výskyt PPE po proléčivu 5-FU (Kroep et al. 2015).
6. *hypotesa*: pyridoxin *in vitro* nesnižuje účinnost 5-FU, což potvrzuje předchozí klinické výsledky (Kang et al. 2010; Ota et al. 2014).

## **4. Metody**

Ke studiu toxického působení 5-FU a protektivního působení potenciálních antidot v léčbě PPE byla zvolena buněčná linie HaCaT. Jedná se o spontánně imortalisované lidské keratinocyty se zachovalou plnou diferenciací kapacitou (Boukamp et al. 1988). Zároveň byly pro potvrzení 1. hypotézy o účinnosti uridinu použity primární keratinocyty.

### **4.1.Chemikálie**

Pyrimidinové nukleosidy byly získány jako prášek s obsahem > 99 % substance v kvalitě pro použití při práci s buněčnými liniemi (SIGMA-ALDRICH s. r. o., Praha, Česká Republika). Pyridoxin, kalciumfolinát a 5-FU byly získány z místní lékárny jako léčivé přípravky PYRIDOXIN LÉČIVA INJ. (Zentiva, k.s., Praha, Česká Republika), CALCIUM FOLINATE EBEWE a 5-FLUOROURACIL EBEWE (obojí od EBEWE Pharma Ges. m. b. H. Nfg. KG, Unterach, Rakousko). Všechny testované látky byly dále ředěny v kultivačním médiu (viz níže) bez pomoci dalších rozpouštědel.

### **4.2.Kultivace buněk**

#### **4.2.1. Kultivace keratinocytů buněčné linie HaCaT**

Buňky HaCaT byly laskavě poskytnuty profesorem Dr. J. Bereiter-Hahnem (Kinematic Cell Research Group, Institute for Cell Biology and Neurosciences, Goethe University Frankfurt am Main, Germany). Jedná se o spontánně imortalisované lidské epitelální buňky s plně zachovalou schopností diferenciací v buňky epidermis (Boukamp et al. 1988). Buňky byly kultivovány v médiu H-MEM (Eaglovo minimální médium v Hankově pufru) doplněném o neesenciální aminokyseliny, 0,12 g/L pyruvátu sodného, 1 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 10 % bovinní sérum, 2 % fetální bovinní sérum a antibiotika (200 U/mL G-penicilin a 100 µg/mL streptomycin). Buňky byly kultivovány v inkubátoru ve vlhké atmosféře při 37°C a 3,5 % CO<sub>2</sub>. Pro kultivaci, NTCA testy a RTCA testy bylo využíváno standardní médium s fenolovou červení. Pro MTT testy bylo použito médium bez fenolové červeně, která by interferovala se spektrofotometrickou kvantifikací koncentrace formazanu.

#### **4.2.2. Kultivace primárních keratinocytů**

Primární keratinocyty byly kultivovány na pomocné vrstvě (feeder-layer) 3T3 myších fibroblastů hustotě 25 000 buněk/cm<sup>2</sup> ozářených letální dávkou roentgenového záření (100Gy, Gammacel 220). Tato metoda byla úspěšně použita na kultivaci primárních buněčných linií karcinomu prsu (Krasna et al. 2003; Matouskova et al. 2000). Letálně ozářené myší fibroblasty slouží jako nedělící se podpůrná vrstva, která je však metabolicky aktivní a podporuje růst primárních buněk. Bylo použito kultivační médium využívané pro kultivaci fibroblastů 3T3, které sestávalo z média H-MEM (Eaglovo minimální médium v Hankově pufru) doplněného o neesenciální aminokyseliny, 0,12 g/L pyruvátu sodného, 1 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 10 % bovinní sérum, 2 % fetální bovinní sérum a antibiotika (penicilin 200 U/mL a streptomycin 100 µg/mL). Dále byl doplněn hydrokortizon 0,5 µg/mL, insulin 5 µg/mL (Actrapid, NovoNordisk), choleratoxin 10<sup>-10</sup> M (Sigma Aldrich) a epidermální růstový faktor EGF 5 ng/mL (Sigma Aldrich). Buňky byly kultivovány v inkubátoru ve vlhké atmosféře při 37°C a 3,5 % CO<sub>2</sub>. Pro kultivaci a NTCA testy bylo využíváno standardní médium s fenolovou červení.

#### **4.3. Měření viability buněk**

Pro kvantifikaci toxického účinku 5-FU a protektivního účinku dalších testovaných látek byly zvoleny 3 různé, navzájem se doplňující metody:

##### **4.3.1. RTCA test (Real Time Cell Analyser)**

Jedná se o plato s 96 jamkami, na jejichž dně jsou 2 zlaté elektrody (Real Time Cell Analyser, xCELLigence®, Roche Applied Sciences). V případě dělení a nárůstu buněk se zvýší impedance mezi elektrodami, což je zaznamenáváno jako hodnota tzv. cell indexu. Pravidelné snímání impedance umožní sledovat nárůst, případně odumírání buněk. Kromě růstu ovlivňují měřenou hodnotu cell indexu i povrchové změny apod., což činí jednoznačnou interpretaci výsledků poněkud složitější, nicméně ve většině případů lze cell index považovat za indikátor buněčné viability (Atienzar et al. 2011). Zjistili jsme, že přístroj velmi citlivě zaznamenává i reakce buněk na krátkodobé změny – např. změnu v parciálním tlaku CO<sub>2</sub> při odklopení víka (i v případě, že do média není přidáván žádný další

roztok). Míra výchylky v průběhu impedanční křivky (cell indexu) se zdá být přímo úměrná viabilitě buněk. Tato metoda byla úspěšně využita pro monitoraci růstu celé řady buněčných linií, včetně HaCaT (Bonifas et al. 2010).

Pro každý pokus byly nasazeny buňky v počtu 14 000 ve 100  $\mu$ L média do všech jamek plata (kromě několika jamek pro kontrolu správného nastavení přístroje). Zjistili jsme, že okrajové jamky není vhodné využívat (podobně, jako u MTT testu), protože pravděpodobně vlivem vysychání, kterému nebylo zabráněno ani humifikací uvnitř inkubátoru, ani nalitím vody mezi jamky, docházelo k výrazným změnám v průběhu křivek cell indexu. Po nastoupení exponenciální fáze růstu cell indexu byly přidávány do jamek s buňkami testované látky ve 100  $\mu$ L média. Zjistili jsme, že mikroskopický obraz buněk v této fázi růstu ukazuje mírně subkonfluentní nárůst (výjimkou jsou buňky, jejichž cell index je znázorněn v grafu 6, ve kterém byl zkoumán vliv konfluence). Cell index byl odečítán každých 15 min po celou dobu trvání pokusu. Uvedené grafy ukazují průběh křivek cell indexu od okamžiku přidání testovaných látek k buňkám, není tedy vidět počáteční fáze nárůstu cell indexu od začátku kultivace. Pro každou testovanou látku, nebo kombinaci látek byly použity minimálně 3 jamky, ze kterých byl následně spočítán průměr a směrodatná odchylka.

#### **4.3.2. MTT test**

MTT test spočívá v přidání MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) do média zkoumaných buněk. Pomocí konstitutivních enzymů dýchacího řetězce dochází k redukci MTT na tmavý, krystalický formazan. Množství formazanu vzniklého za určitý časový úsek (6 hodin) se odečítá po rozpuštění v roztoku laurylsulfátu sodného (SDS) spektrofotometricky a je přímo úměrné viabilitě buněk, která je měřena jako jejich metabolická aktivita. V klasické podobě se jedná o end point test, který neumožňuje monitoring metabolické aktivity v čase (Mosmann 1983), nicméně vzhledem ke zjištění, že časová složka hraje velmi výraznou roli v projevu toxicity a mnohá antidota se liší právě v oddálení jejího nástupu (Hartinger et al. 2012) jsme zvolili v některých případech postup, kdy jsme zabarvovali jamky postupně v průběhu několika dnů, čímž bylo umožněno sledování vývoje viability v čase.

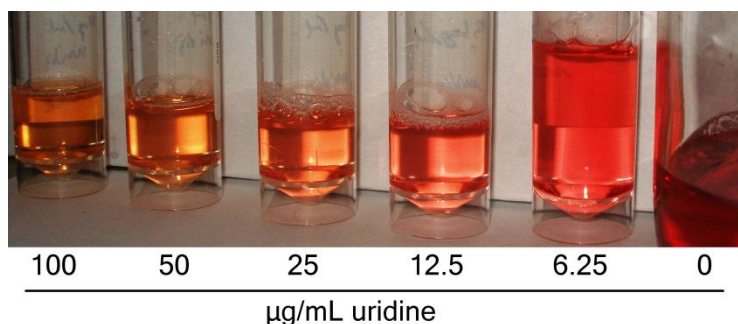
Buňky byly kultivovány v 96 jamkových platech (často bylo v rámci jednoho pokusu použito několik plat najednou). Inokulace činila 14 000 buněk na každou jamku ve 100  $\mu$ L média bez fenolové červeně. Okrajové jamky byly naplněny pouze sterilní vodou pro injekce, aby bylo zamezeno odpařování z plata. Celkem šlo tedy využít pouze 10x6 jamek na plato. Po zkontrolování nárůstu

buněk byly v okamžiku, kdy mikroskopické zhodnocení ukázalo lehce subkonfluentní vrstvy, přidány testované látky ve 100  $\mu\text{L}$  kultivačního média. Metabolická aktivita byla měřena v různých časových odstupech po přidání látek (viz jednotlivé grafy): Do jamek bylo přidáno 10  $\mu\text{L}$  MTT (5 mg/mL v PBS). Po šesti hodinách byla metabolisace ukončena rozpuštěním buněk i vyprodukovaného formazanu pomocí 100  $\mu\text{L}$  10 % SDS v destilované vodě. Pro každou látku/kombinaci látek a každý odečet byly použity minimálně 3 jamky, ze kterých byl následně spočítán průměr a směrodatná odchylka. Po 24 hodinovém působení SDS byl proveden odečet na spektrofotometru (Tecan Sunrise™ microplate reader se software Magellan™) při vlnové délce 570 nm s pozadím 630 nm. Míra absorbance je indikátorem buněčné viability.

#### 4.3.3. NTCA (Nondestructive Test of Cellular Activity)

NTCA (Nondestructive Test of Cellular Activity) spočívá v kultivaci buněk na platech s dvanácti nebo 24 jamkami, resp. na Petriho miskách a odečítání toxického účinku podle barvy média s obsahem fenolové červeně, případně hodnocení morfologie na mikrofotografiích. Odečítání barvy media nebylo možno v našich pokusech využít, neboť uridin ve vyšších koncentracích snižoval pH a zabarvoval medium do žluta (obr. 11). Naopak 5-FU spíše měnil zabarvení do červena. Mikrofotografie byly pořízeny po obarvení buněk dle May-Grünwalda a Giemsy-Romanowského (Netikova et al. 2007).

Buňky byly nasazovány v různém množství podle velikosti kultivační plochy (např. 100 000 buněk na Petriho misku o průměru 35 mm). Ve chvíli, kdy byly buňky lehce subkonfluentní bylo kultivační médium odsáto a rychle přidáno čerstvé médium s rozpuštěnými testovanými látkami. Po několika dnech byl pokus ukončen a buňky zabarveny. Přesná doba působení testovaných látek je popsána u každého pokusu v sekci výsledků. Mikrofotografie byly pořizovány ve čtyřicetinasobném, nebo stonásobném zvětšení.



Obrázek 11. Zabarvení kultivačního média s fenolovou červení různou koncentrací uridinu.

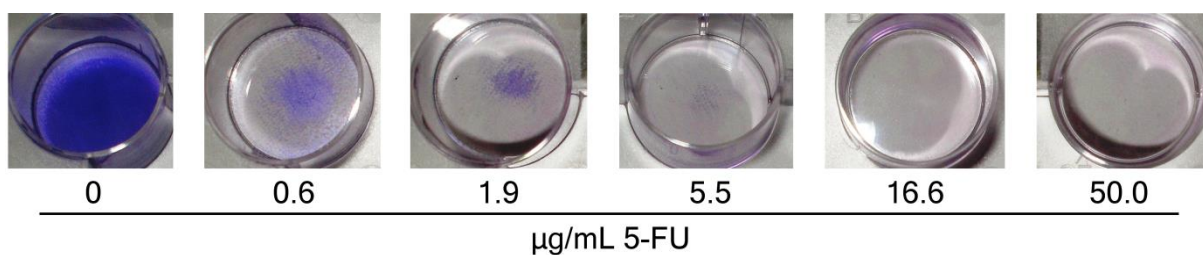


## 5. Výsledky

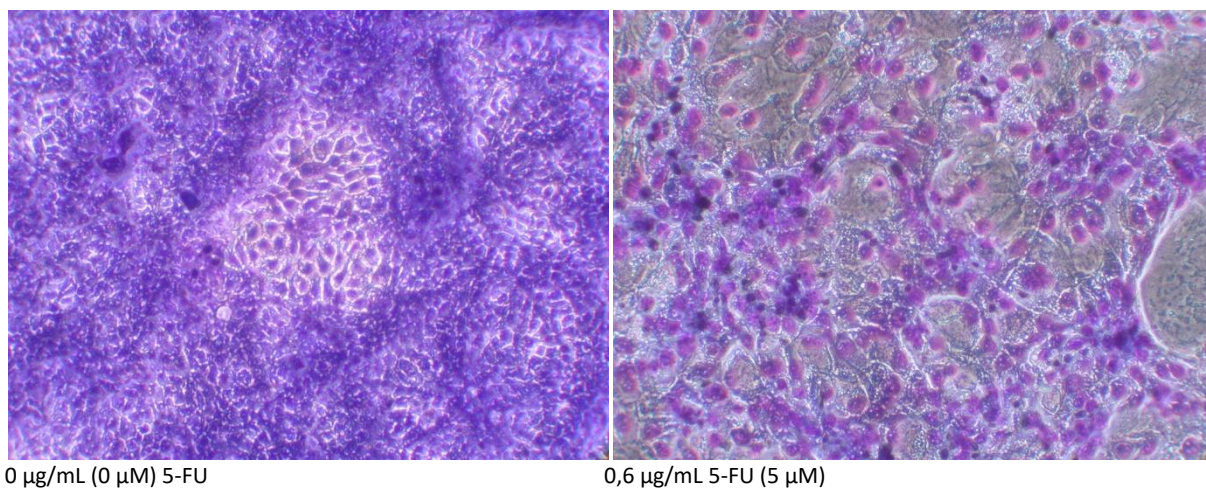
Viabilita buněk v testech toxicity 5-FU a protektivního efektu potenciálních antidot byla měřena třemi rozdílnými a navzájem se doplňujícími metodami – NTCA testem (mikrofotografie), MTT testem (metabolická aktivita) a RTCA testem (měření impedance na dně jamky s narostlými buňkami).

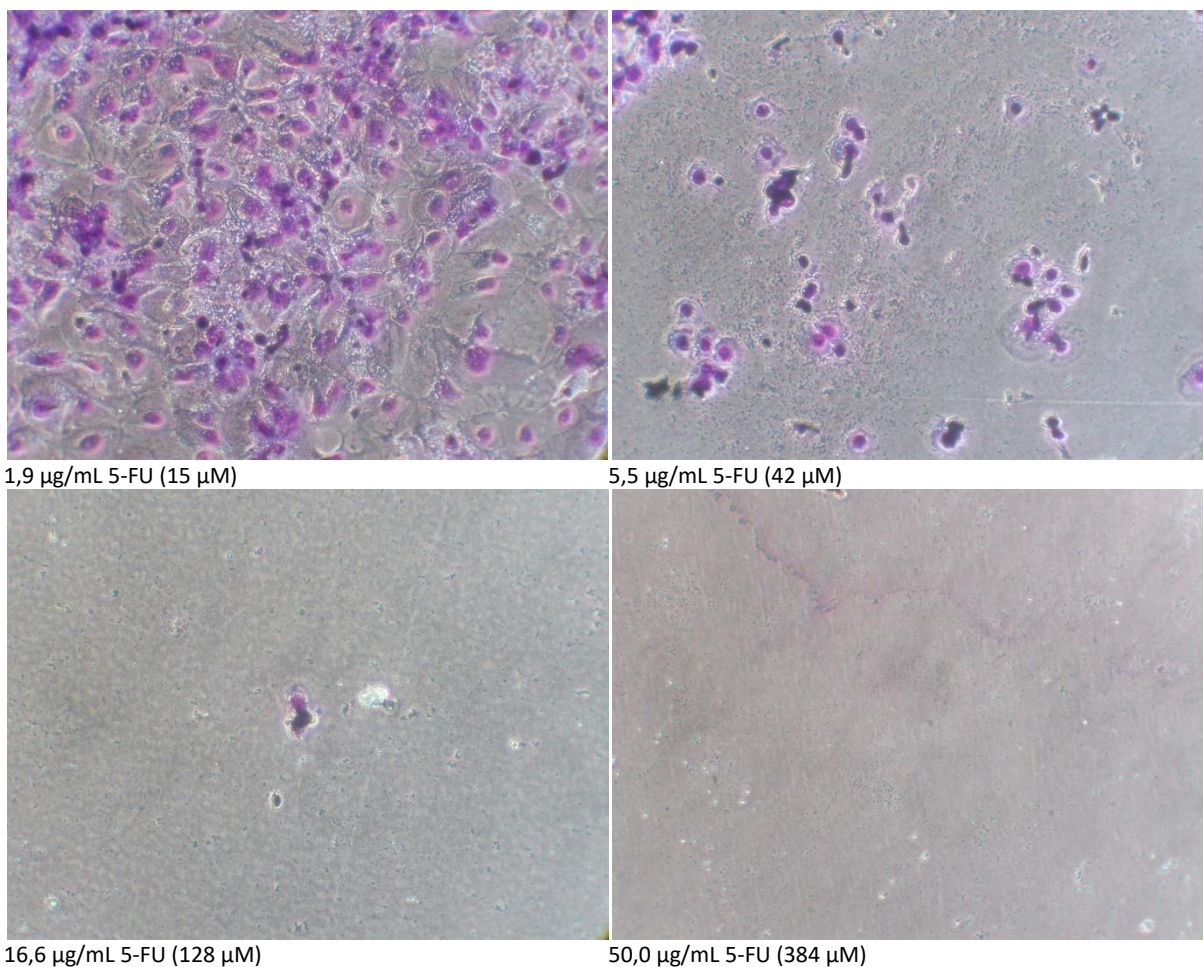
### 5.1. Toxicita 5-FU na buněčnou linii HaCaT

Na základě NTCA testu bylo zjištěno, že 5-FU je pro keratinocyty linie buněčné HaCaT toxický již v koncentraci 0,6  $\mu\text{g/mL}$  (obr. 12 a 13).



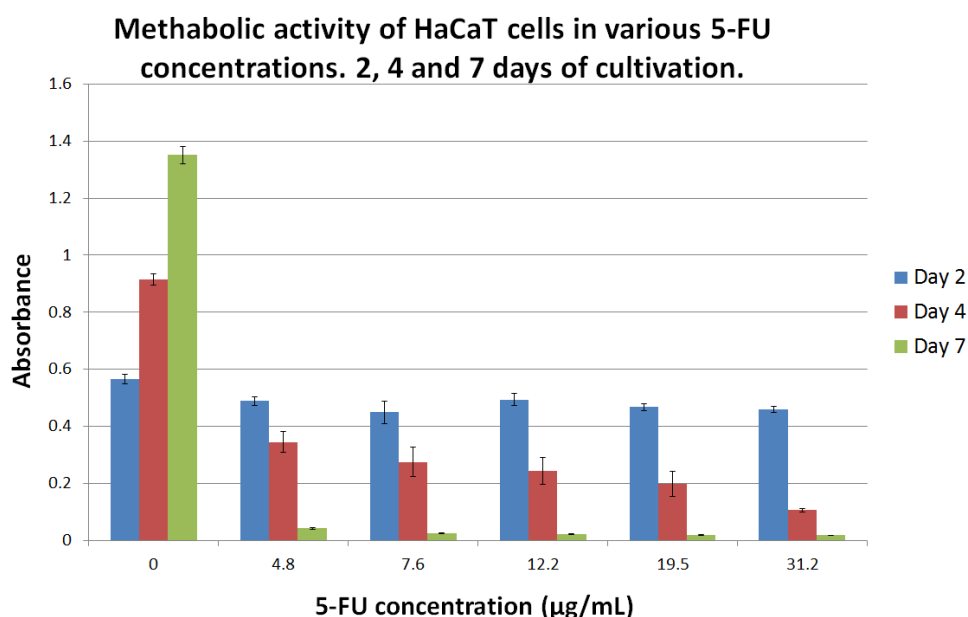
Obrázek 12. NTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Nárůst buněk na platech s různou koncentrací 5-FU. Buňky byly vystaveny působení 5-FU po dobu 2 dnů a následně byly 3 dny kultivovány v čerstvém médiu bez 5-FU (nepublikovaná data).





*Obrázek 13. 100x zvětšené mikrofotografie HaCaT keratinocytů. V médiu buněk byly různé koncentrace 5-FU po dobu 2 dnů. Následně byly buňky 3 dny kultivovány v čerstvém médiu bez 5-FU (nepublikovaná data).*

Je patrné, že 5-FU působil na HaCaT keratinocyty silně toxicky i v nejnižší koncentraci (0,6 µg/mL, resp. 5 µM). Mikrofotografie ukazují proliferaci v jamkách s koncentrací 0,6 a 1,9 µg/mL 5-FU (zcela nesrovnatelnou s kontrolními buňkami). Při vyšších koncentracích však byly buňky zcela zničeny (obr. 12 a 13) a ani po 3 dnech kultivace v čerstvém médiu nedošlo k jejich opětovnému nárůstu (obr. 12 a 13).



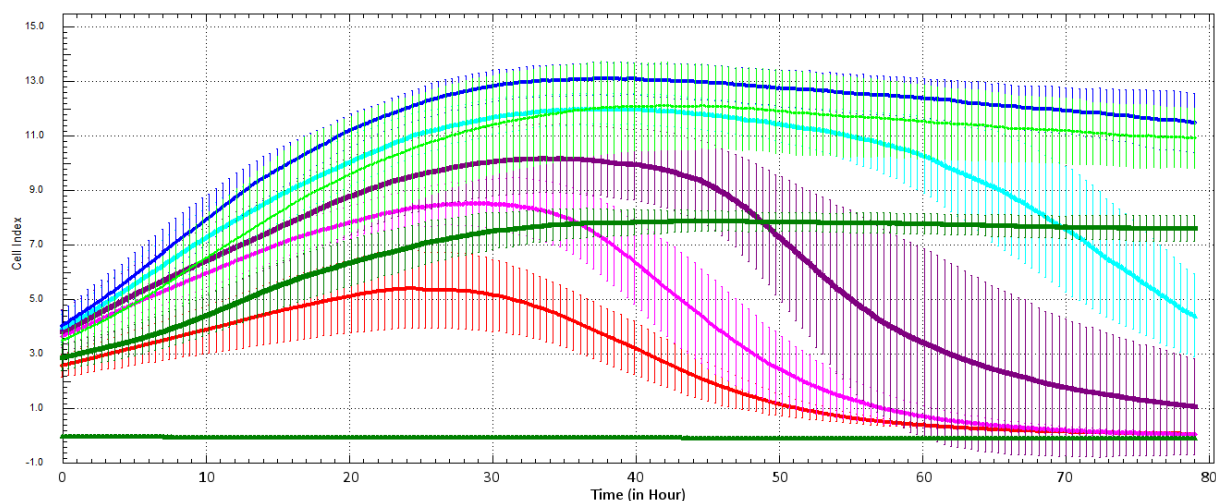
*Graf 2. MTT test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Vývoj metabolické aktivity buněk kultivovaných v různých koncentracích 5-FU po dobu 2, 4 a 7 dnů (nepublikovaná data).*

Z výsledků MTT testu buněk kultivovaných v rozdílných koncentracích 5-FU (graf 2) je patrné, že zatímco buňky bez 5-FU kontinuálně zvyšují metabolickou aktivitu v čase až do sedmého dne, buňky, v jejichž médiu je přítomen 5-FU, postupně umírají i v nejnižší zkoumané koncentraci (4,8 µg/mL, 37 µM). Po dvou dnech byly rozdíly v metabolické aktivitě oproti kontrolním buňkám pouze minimální. 4. den byl pokles metabolické aktivity úměrný koncentraci 5-FU a 7. den již nebyla v jamkách s buňkami, v jejichž médiu byl 5-FU, metabolická aktivita téměř měřitelná nehledě na koncentraci 5-FU (graf 2).

Toxicita 5-FU v různých koncentracích měřená pomocí RTCA testu (graf 3) je úměrná dávce a je patrná od dávky 1,9 µg/mL (15 µM). V rozporu s NTCA testem nebyla zaznamenána toxicita 5-FU v koncentraci 0,6 µg/mL (5 µM), naopak buňky v nižších koncentracích 5-FU dosahují vyšších hodnot cell indexu, než kontrola.

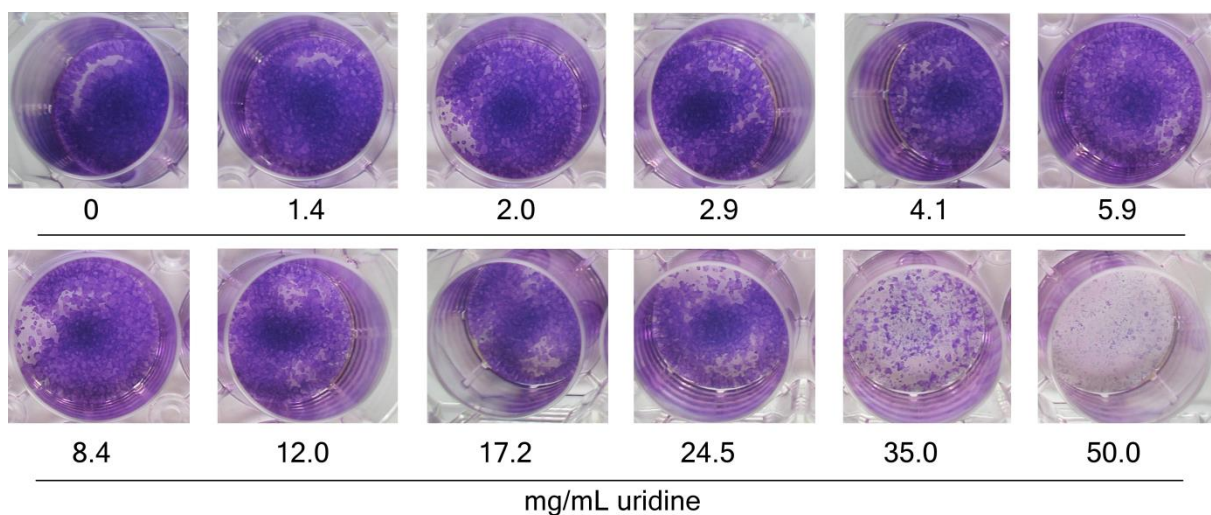
Výsledky tří různých metod potvrdily velmi vysokou citlivost buněk HaCaT k toxicitě 5-FU. Toxicita je patrná v RTCA testu od koncentrace 1,9 µg/mL (15 µM), pomocí NTCA testu byla zaznamenána toxicita již v koncentraci 0,6 µg/mL (5 µM). Do dalších pokusů byly zvoleny koncentrace 7,5 µg/mL, 31,2 µg/mL a 50 µg/mL 5-FU. Všechny tyto koncentrace jsou pro HaCaT linii lidských keratinocytů vysoce toxické. Podle výsledků NTCA testů s primárními keratinocyty (obr. 27, 30 a 31) se zdá, že tento typ buněk je méně citlivý k toxicitě 5-FU, než buňky HaCaT.





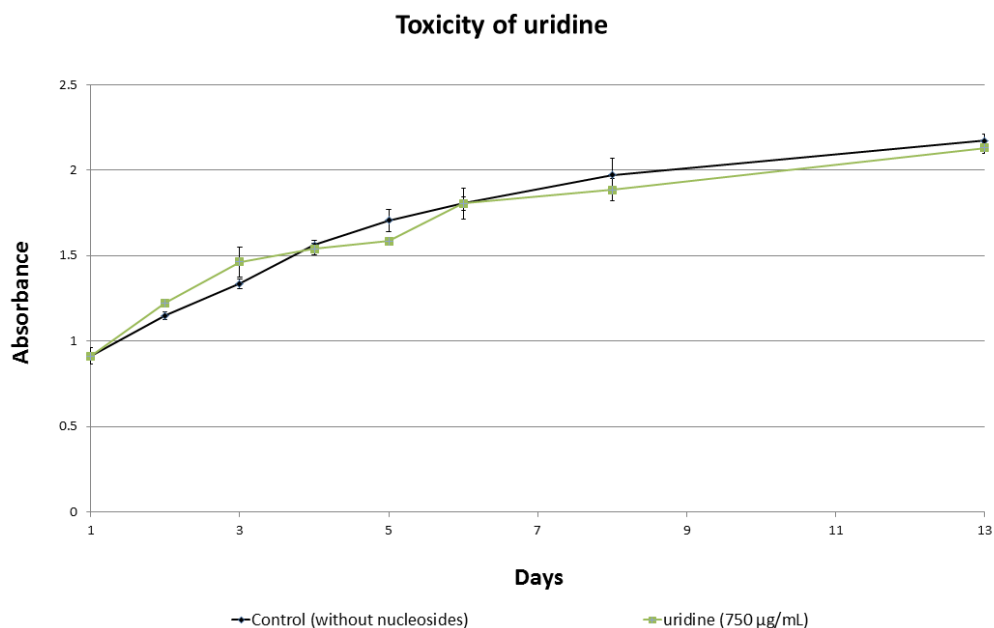
Graf 3. RTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Toxicita 5-FU v koncentraci ■ - 50  $\mu\text{g/mL}$  (384  $\mu\text{M}$ ), ■ - 16,7  $\mu\text{g/mL}$  (128  $\mu\text{M}$ ), ■ - 5,6  $\mu\text{g/mL}$  (43  $\mu\text{M}$ ), ■ - 1,9  $\mu\text{g/mL}$  (15  $\mu\text{M}$ ), ■ - 0,6  $\mu\text{g/mL}$  (5  $\mu\text{M}$ ), ■ - 0,2  $\mu\text{g/mL}$  (2  $\mu\text{M}$ ), ■ - kontrola (rovná zelená linie na spodní části grafu značí pouze jamky s médiem bez buněk) (nepublikovaná data).

## 5.2.Toxicita uridinu



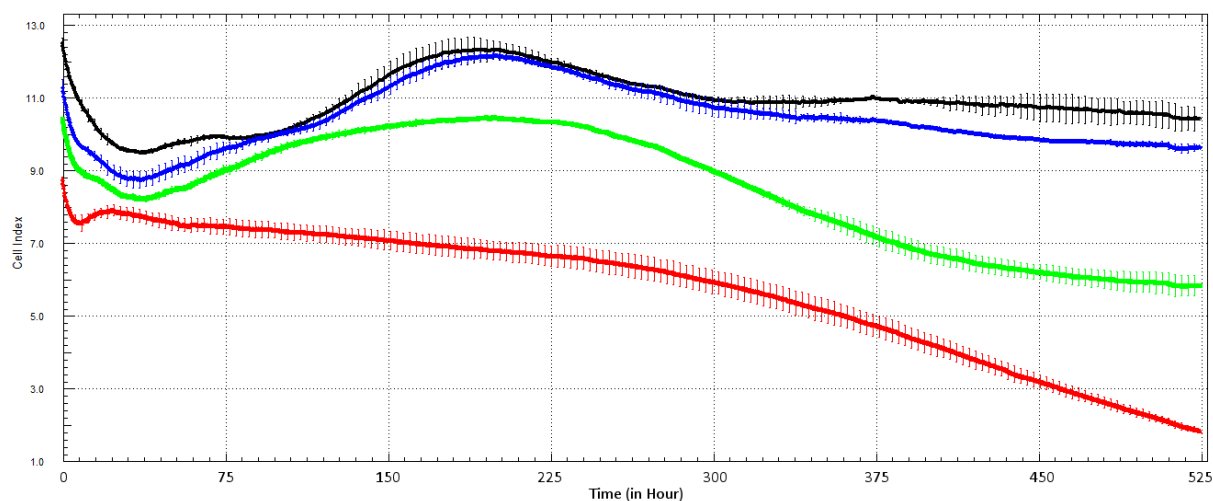
Obrázek 14. NTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Nárůst buněk na platech s různou koncentrací uridinu. Buňky byly obarveny po 3 dnech působení uridinu (nepublikovaná data).

Uridin působil na HaCaT keratinocyty toxicky od koncentrace 35 mg/mL (143,3 mM, obr. 14 a 16).

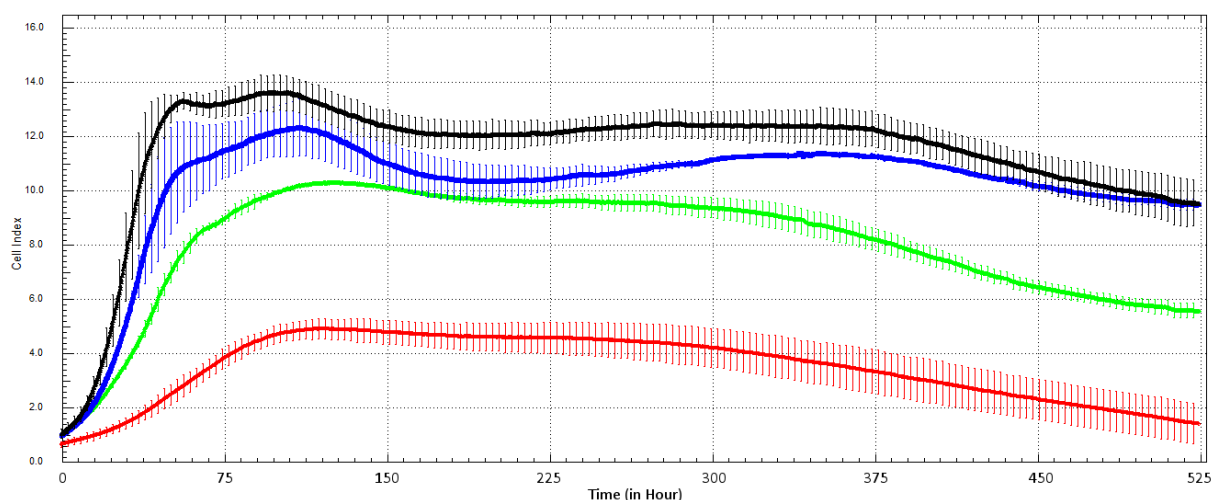


Graf 4. MTT test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Porovnání metabolické aktivity buněk v přítomnosti 750 µg/mL (3,07 mM) uridinu oproti kontrolním buňkám bez přítomnosti uridinu v médiu (nepublikovaná data).

V MTT testu bylo potvrzeno, že 750 µg/mL (3,07 mM) uridinu do 13. dne nemění průběh křivky znázorňující metabolickou aktivitu buněk oproti průběhu křivky kontrolních buněk bez uridinu.



Graf 5. RTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Působení uridinu v různých koncentracích v čase. Buňky byly konfluentní v okamžiku, kdy bylo přidáno medium s uridinem. ■ - 4000 µg/mL (16,38 mM), ■ - 500 µg/mL (2,05 mM), ■ - 50 µg/mL (0,21 mM), ■ - kontrola (nepublikovaná data).

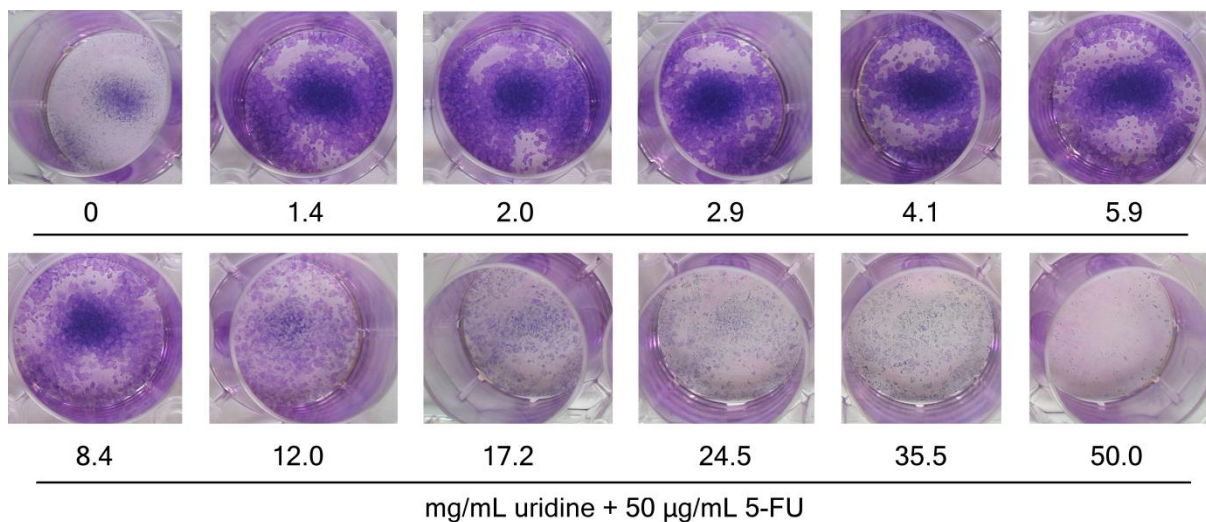


Graf 6. RTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Působení uridinu v různých koncentracích v čase. **Buňky nebyly konfluentní v okamžiku, kdy začal uridin působit (buňky byly nasazeny do média s uridinem).** ■ - 4000 µg/mL (16,38 mM), ■ - 500 µg/mL (2,05 mM), ■ - 50 µg/mL (0,21 mM), ■ - kontrola (nepublikovaná data).

Pomocí RTCA testu byl zkoumán vliv uridinu v průběhu 21 dní (525 hodin) jak na rostoucí buňky (tedy buňky, v jejichž médiu byl uridin již při nasazování na plato, graf 6), tak vliv uridinu na buňky již konfluentní (resp. v exponenciální fázi růstu cell indexu, graf 5). Přestože v NTCA testu nebyl ani v koncentraci 4,1 mg/mL zaznamenán toxický efekt uridinu po 3 dnech působení (obr. 14 a 16), v průběhu času v RTCA testu byl zaznamenán při koncentraci 4 mg/mL pokles cell indexu u buněk původně konfluentních (graf 5) a u nově nasazených buněk menší nárůst cell indexu oproti buňkám kontrolním (graf 6). Určitá retardace růstu a menší hodnoty cell indexu byly zaznamenány po cca 13 dnech (300 hodinách) rovněž v koncentraci 500 µg/mL (2 mM) uridinu. Tento efekt nebyl zaznamenán v MTT testu, kde ani koncentrace 750 µg/mL (3,07 mM) uridinu nezpůsobila odchylku křivky od křivky kontrolních buněk (graf 4), nicméně MTT test byl ukončen již 13. den (312 hodin). Křivka cell indexu buněk s uridinem v koncentraci 50 µg/mL (0,21 mM) probíhala podobně jako křivka kontrolních buněk (graf 5 a 6).

### 5.3. Protektivní účinek uridinu na buňky v přítomnosti 5-FU

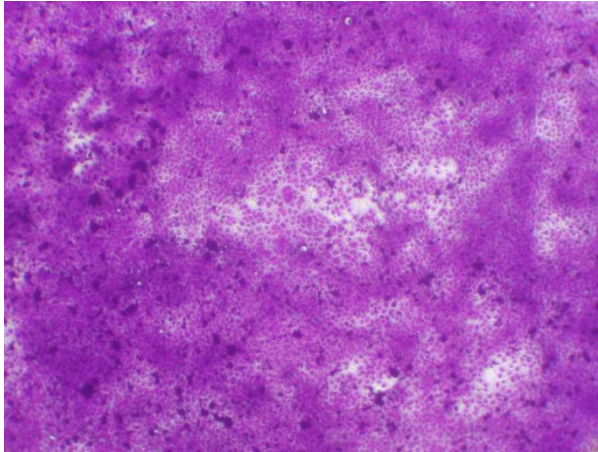
#### 5.3.1. Různé koncentrace uridinu + 50 µg/mL (384,6 µM) 5-FU



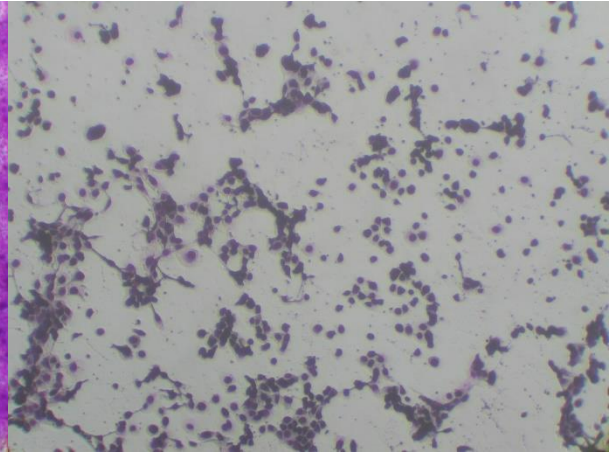
Obrázek 15. NTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Nárůst buněk na platech s různou koncentrací uridinu v přítomnosti 50 µg/mL (384 µM) 5-FU. Buňky byly obarveny po 3 dnech působení 5-FU a uridinu (nepublikovaná data).

Zajímavé bylo doplnění výsledků, které jsme získali při zjišťování toxicity uridinu (obr. 14) o podobný pokus, kdy byla „toxicita/protektivní efekt“ stejných koncentrací uridinu měřena v přítomnosti 50 µg/mL (384 µM) 5-FU. Experiment nebyl navržen za účelem zjištění minimální účinné koncentrace uridinu (takový pokus viz dále, obr. 17), ale pouze jako doplnění předchozích výsledků (obr. 14). Uridin ochraňuje buňky proti toxickému působení 5-FU již od koncentrace 1,4 mg/mL (5,7 mM). Zajímavé je, že zatímco samotný uridin působí v NTCA testu toxicky na buňky až od koncentrace 35,0 mg/mL (143,3 mM, obr. 3 a 5), v přítomnosti 5-FU se toxicita projevuje již v koncentraci 12,0 mg/mL (49,1 mM, obr. 15 a 16). Srovnání mikrofotografií buněk, v jejichž médiu je samotný uridin, nebo uridin současně s 50 µg/mL 5-FU je na obrázku 16.

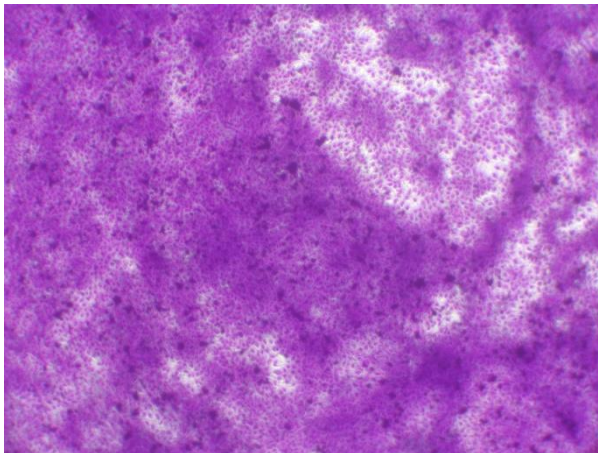




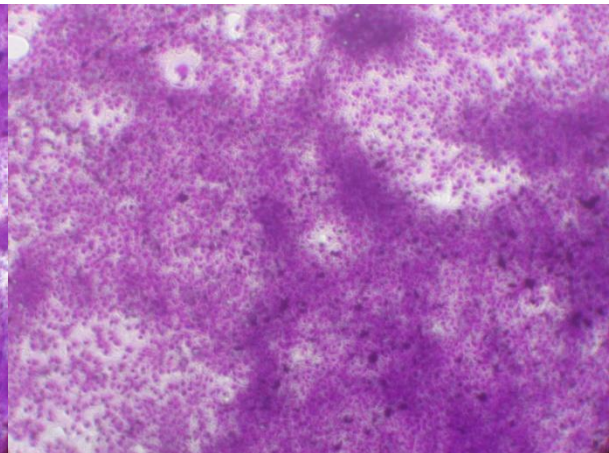
0 mg/mL uridinu



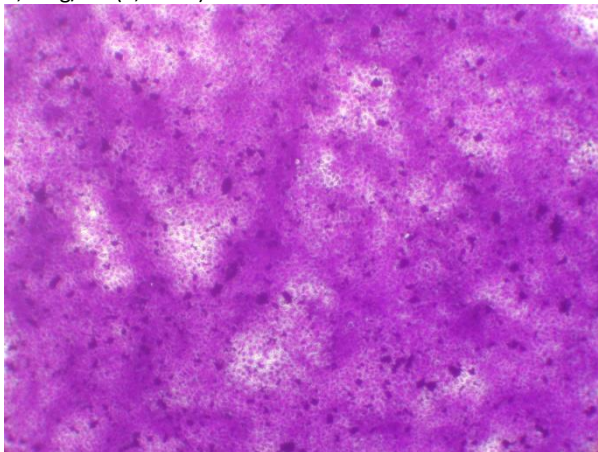
0 mg/mL uridinu + 50 µg/mL 5-FU



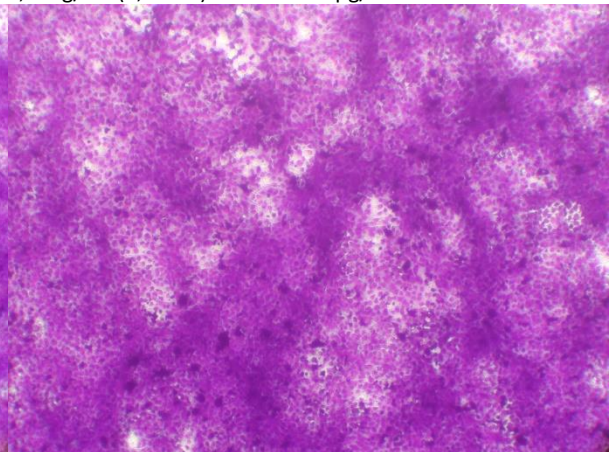
1,4 mg/mL (5,7 mM) uridinu



1,4 mg/mL (5,7 mM) uridinu + 50 µg/mL 5-FU

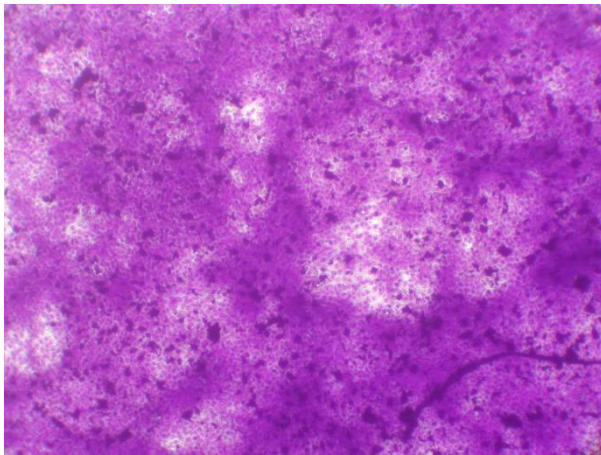


2,0 mg/mL (8,2 mM) uridinu

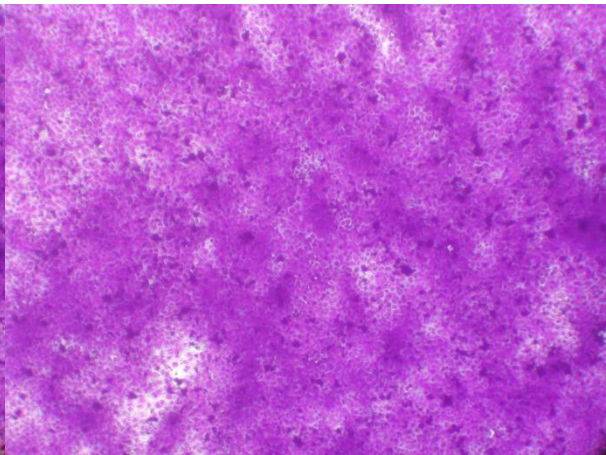


2,0 mg/mL(8,2 mM) uridinu + 50 µg/mL 5-FU

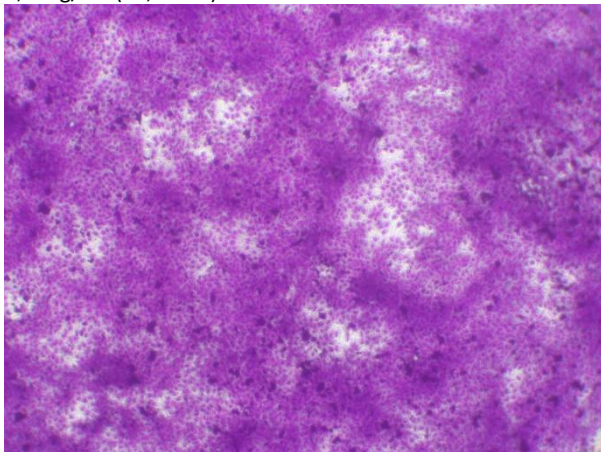




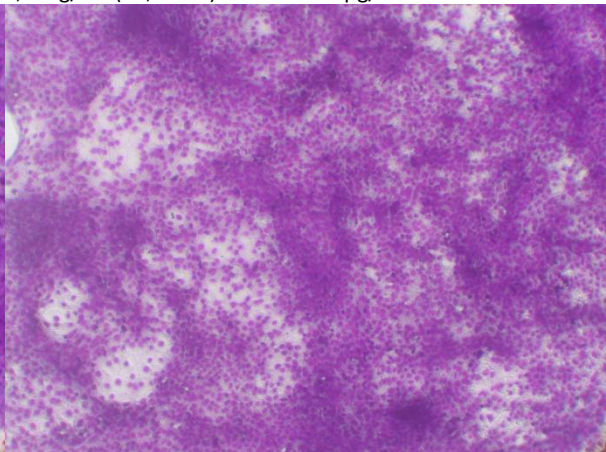
2,9 mg/mL (11,9 mM) uridinu



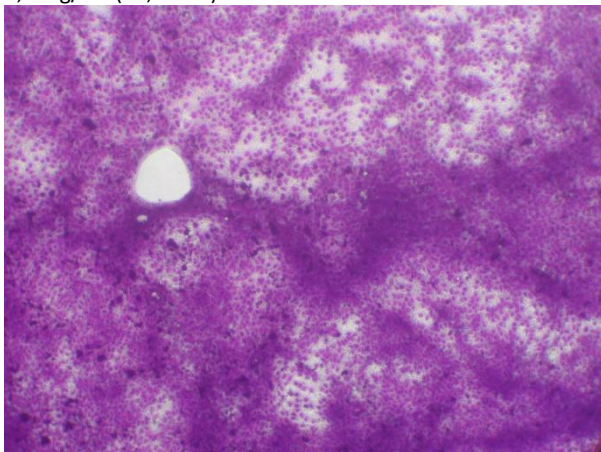
2,9 mg/mL (11,9 mM) uridinu + 50 µg/mL 5-FU



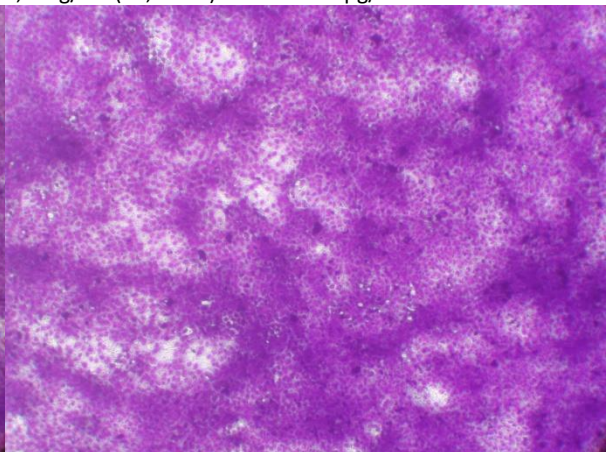
4,1 mg/mL (16,8 mM) uridinu



4,1 mg/mL (16,8 mM) uridinu + 50 µg/mL 5-FU

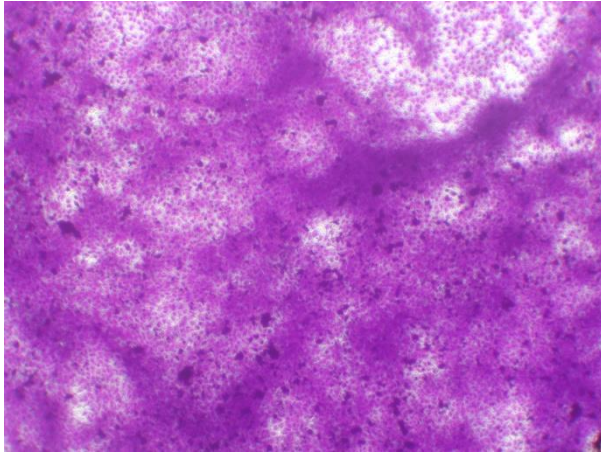


5,9 mg/mL (24,2 mM) uridinu

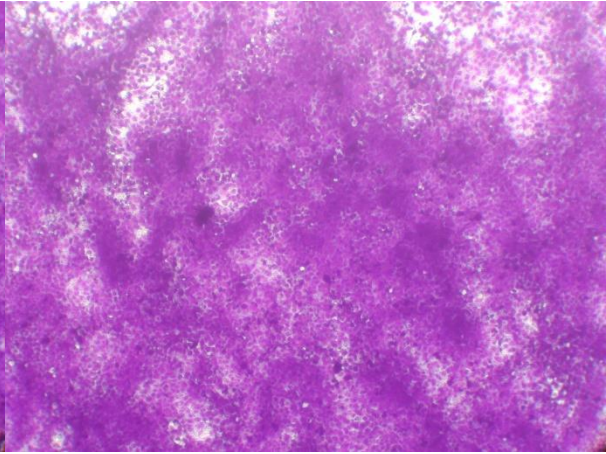


5,9 mg/mL (24,2 mM) uridinu + 50 µg/mL 5-FU

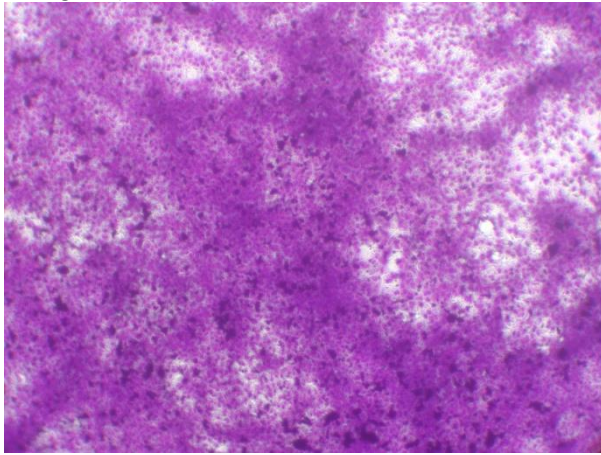




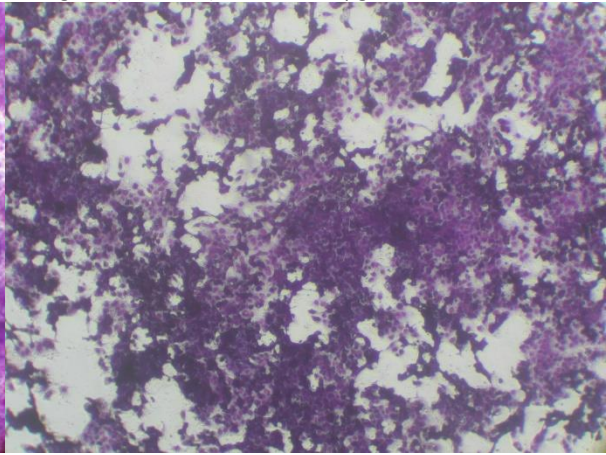
8,4 mg/mL (34,4 mM) uridinu



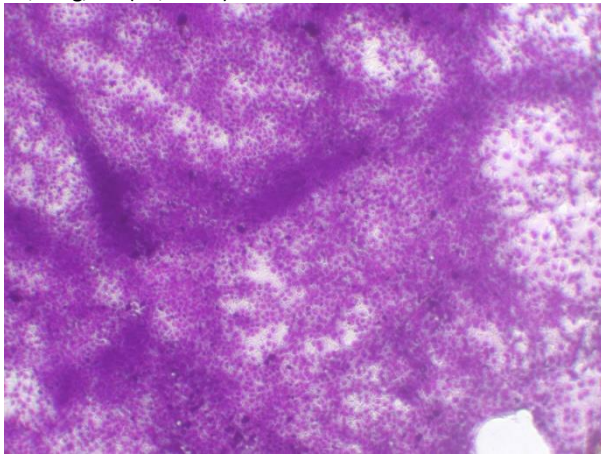
8,4 mg/mL (34,4 mM) uridinu + 50 µg/mL 5-FU



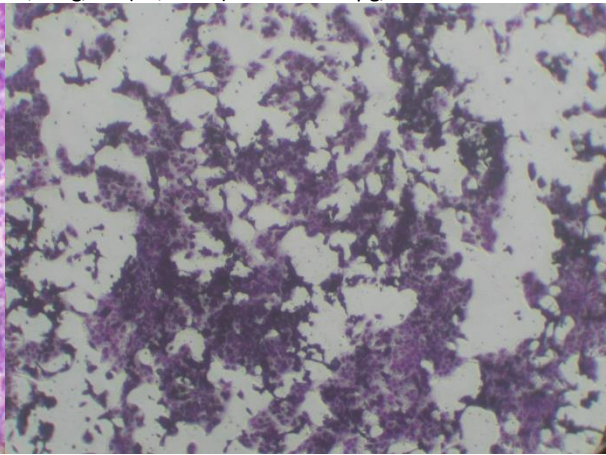
12,0 mg/mL (49,1 mM) uridinu



12,0 mg/mL (49,1 mM) uridinu + 50 µg/mL 5-FU

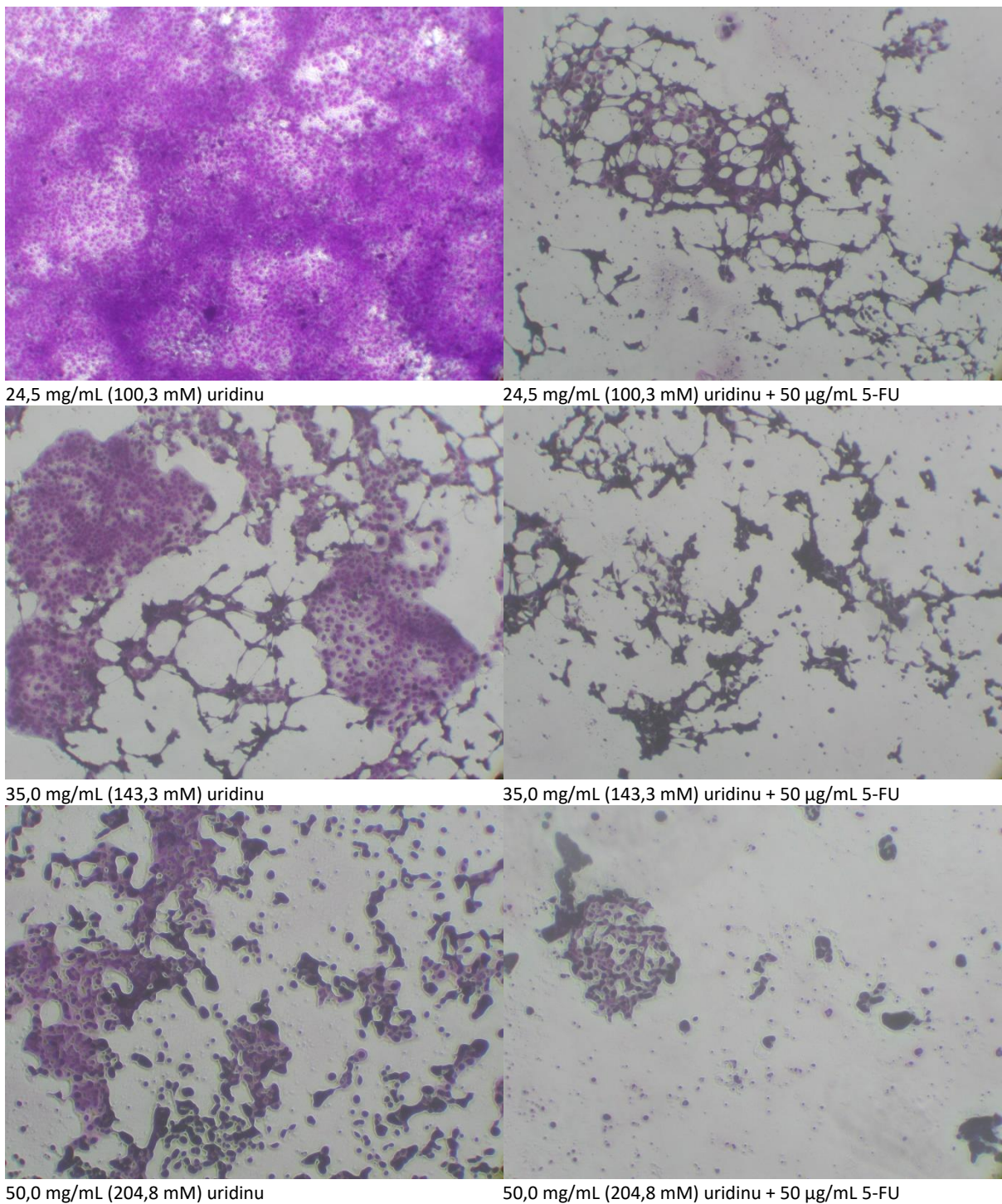


17,2 mg/mL (70,4 mM) uridinu



17,2 mg/mL (70,4 mM) uridinu + 50 µg/mL 5-FU

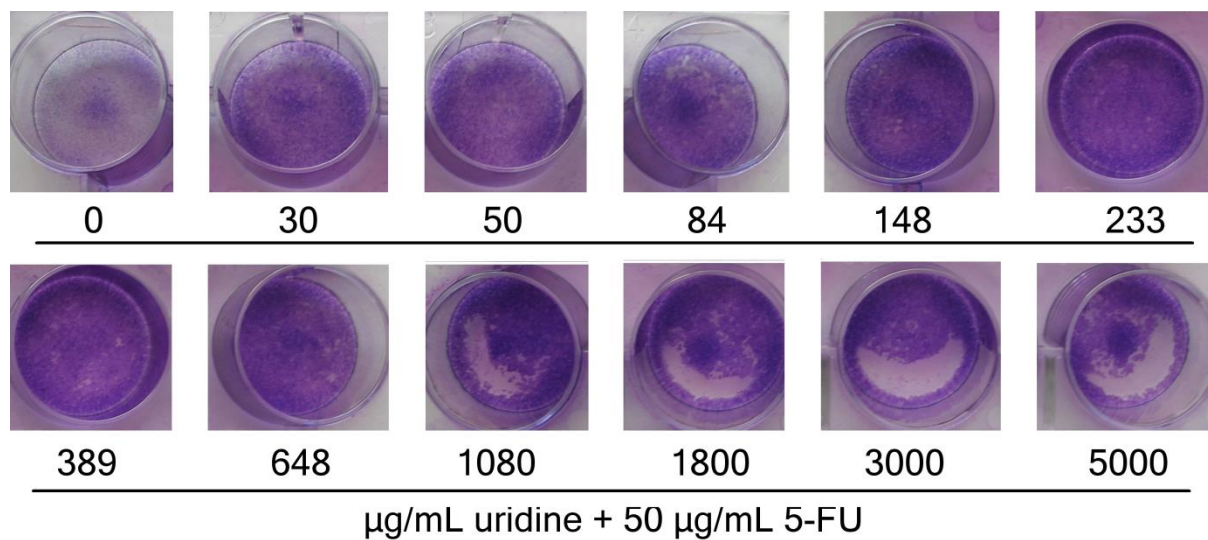




*Obrázek 16. 40x zvětšené mikrofotografie HaCaT keratinocytů. Srovnání mikrofotografií buněk ošetřených různými koncentracemi uridinu. Vlevo buňky bez 5-FU, vpravo buňky s 50 µg/mL 5-FU. Buňky byly obarveny po 3 dnech působení 5-FU a uridinu (nepublikovaná data).*

### 5.3.2. Minimální protektivní koncentrace uridinu v přítomnosti 5-FU

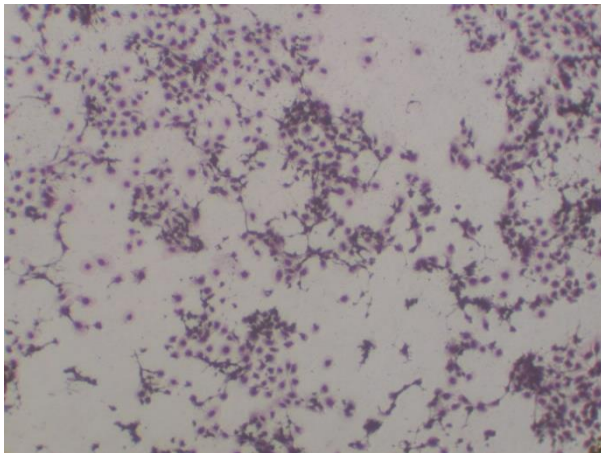
Byl proveden test s 50  $\mu\text{g/mL}$  (384,6  $\mu\text{M}$ ) 5-FU a vzestupnou koncentrační řadou uridinu od koncentrace 30  $\mu\text{g/mL}$  (123  $\mu\text{M}$ ) do 5  $\text{mg/mL}$  (20,5  $\text{mM}$ ) za účelem zjištění nejnižší ještě účinné koncentrace uridinu (obr. 17).



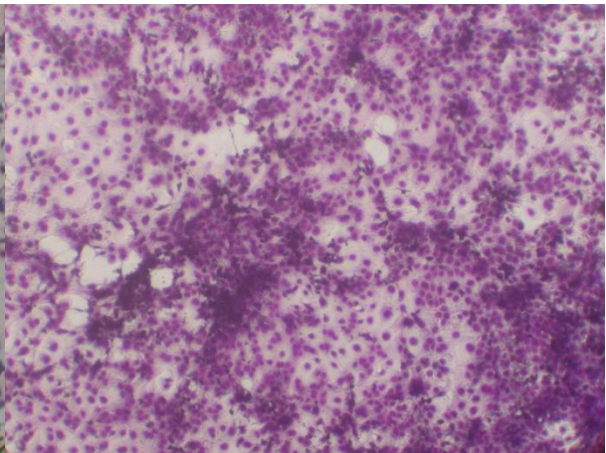
Obrázek 17. NTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Nárůst buněk na platěch s různou koncentrací uridinu v přítomnosti 50  $\mu\text{g/mL}$  (384,6  $\mu\text{M}$ ) 5-FU. Buňky byly obarveny po 3 dnech působení 5-FU a uridinu. Srpký při vyšších koncentracích jsou artefakty vzniklé při barvení (nepublikovaná data).

Podle nárůstu na platu má určitý protektivní účinek i nejmenší koncentrace uridinu (30  $\mu\text{g/mL}$  (122  $\mu\text{M}$ ), obr. 17). Podle mikrofotografií (obr. 18) jsou však na platu s koncentrací uridinu 30  $\mu\text{g/mL}$  (detail na obr. 19) patrné projevy apoptosy, které nebyly při vyšších koncentracích uridinu zřejmé. Koncentrace uridinu od 50  $\mu\text{g/mL}$  (204,8  $\mu\text{M}$ ) výše tedy působily dostatečně protektivně, aby bylo zabráněno cytotoxickým projevům 5-FU po dobu působení tří dnů. Pro zjištění vývoje protektivního účinku v čase není NTCA test vhodný. Pro přesnější zjištění vývoje toxicity 5-FU v čase byly provedeny MTT a RTCA testy (grafy 7-11).

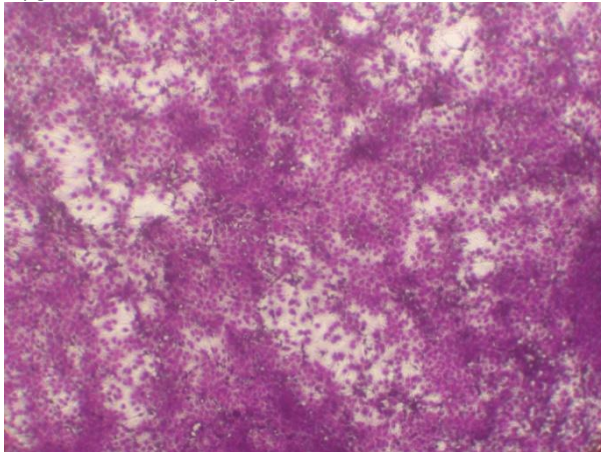




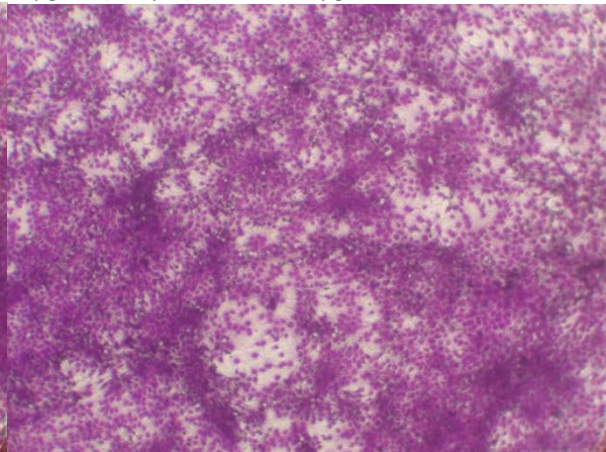
0 µg/mL uridinu + 50 µg/mL 5-FU



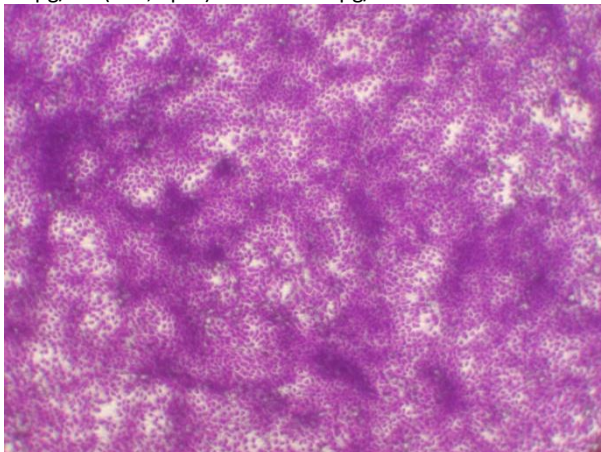
30 µg/mL (122 µM) uridinu + 50 µg/mL 5-FU



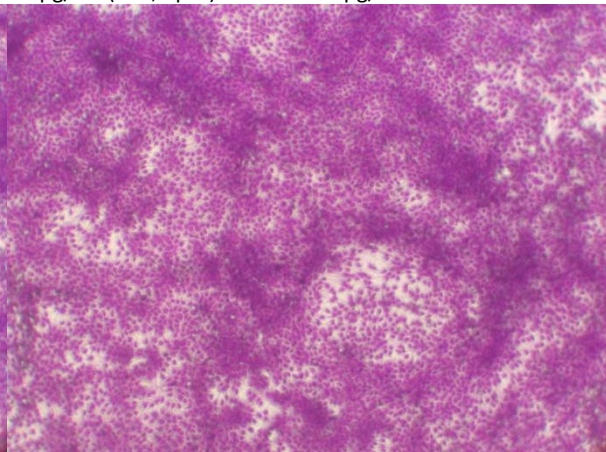
50 µg/mL (204,8 µM) uridinu + 50 µg/mL 5-FU



84 µg/mL (344,0 µM) uridinu + 50 µg/mL 5-FU

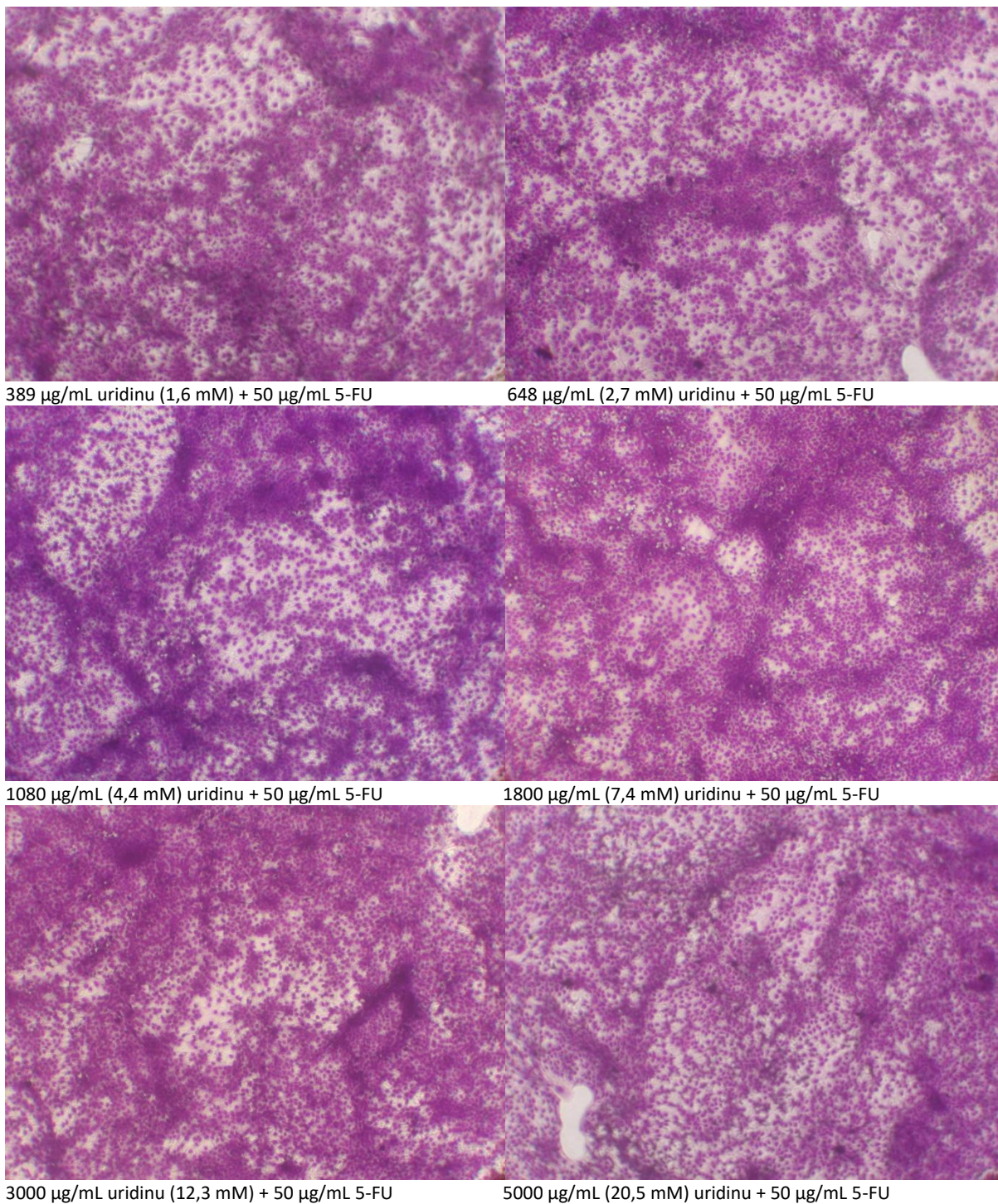


148 µg/mL uridinu (606,0 µM) + 50 µg/mL 5-FU



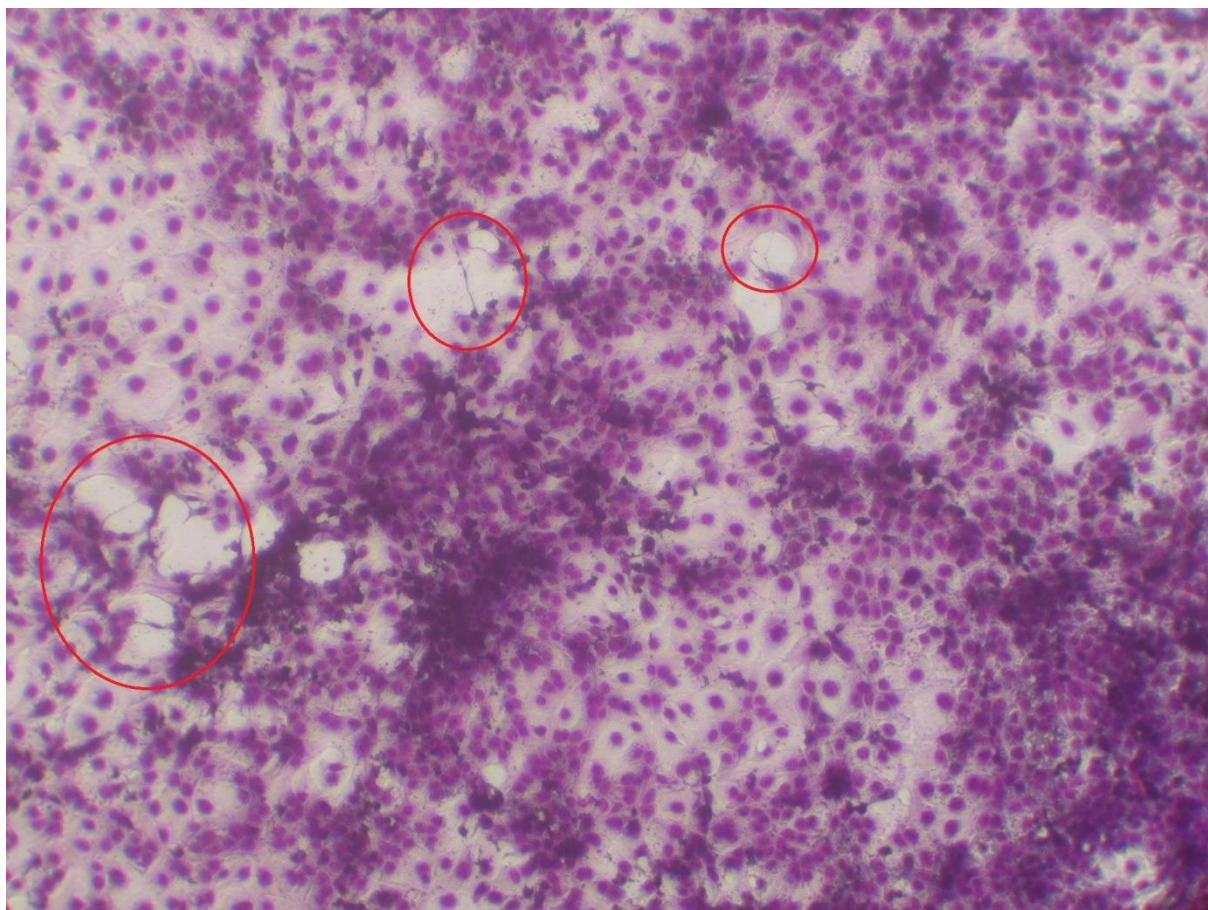
233 µg/mL uridinu (954,1 µM) + 50 µg/mL 5-FU





*Obrázek 18. 40x zvětšené mikrofotografie HaCaT keratinocytů. Srovnání mikrofotografií buněk ošetřených různými koncentracemi uridinu v přítomnosti 50 µg/mL (384,6 µM) 5-FU. Buňky byly obarveny po 3 dnech působení 5-FU a uridinu (nepublikovaná data).*

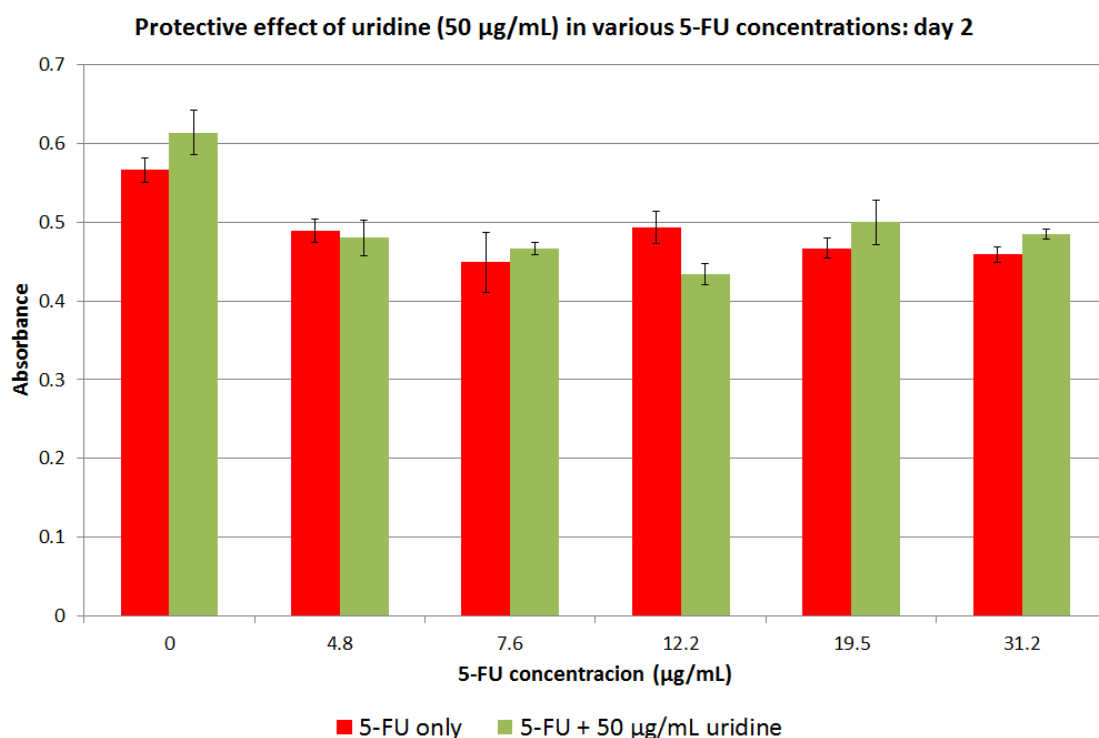




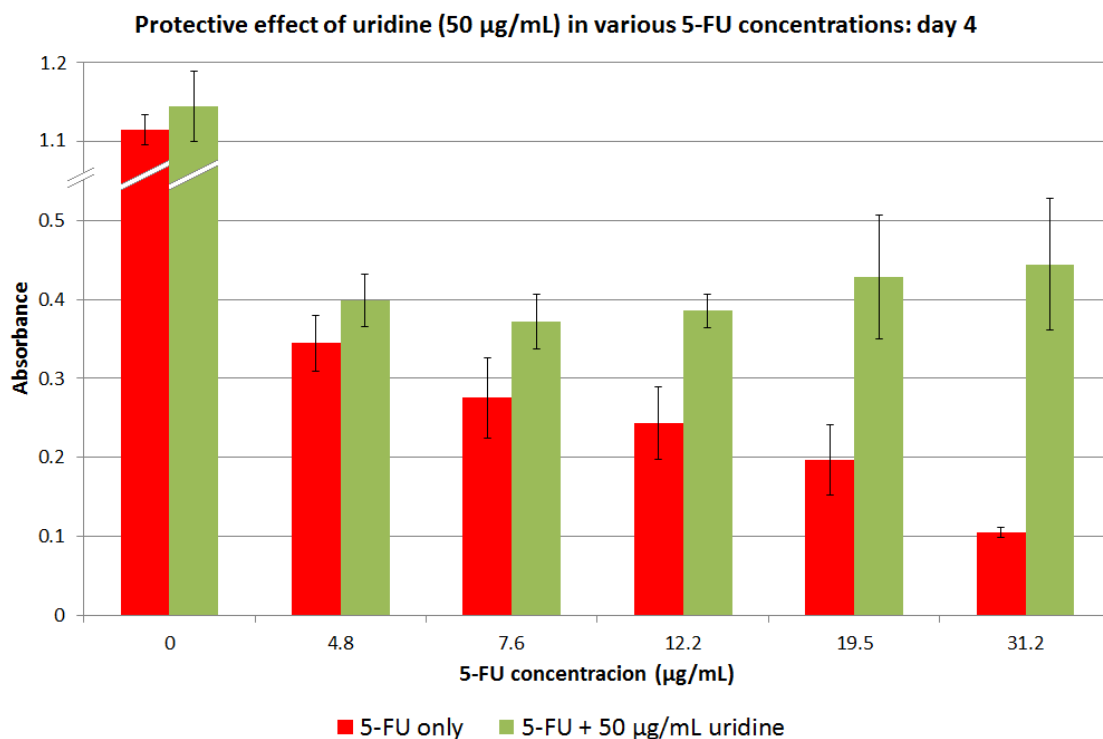
*Obrázek 19. 40x zvětšené mikrofotografie HaCaT keratinocytů. Detail buněk, v jejichž médiu bylo 30  $\mu\text{g/mL}$  (122,9  $\mu\text{M}$ ) uridinu + 50  $\mu\text{g/mL}$  (384,6  $\mu\text{M}$ ) 5-FU s vyznačenými místy, kde probíhá apoptosa. Buňky byly obarveny po 3 dnech působení 5-FU a uridinu (nepublikovaná data).*

### **5.3.3. Toxicita různých koncentrací 5-FU v přítomnosti 50 $\mu\text{g/mL}$ (204,8 $\mu\text{M}$ ) uridinu (MTT testy a RTCA testy)**

MTT testem byl zkoumán protektivní účinek 50  $\mu\text{g/mL}$  (204,8  $\mu\text{M}$ ) uridinu v různých koncentracích 5-FU po 2., 4. a 7. dnech působení (grafy 7, 8 a 9). Koncentrace 50  $\mu\text{g/mL}$  uridinu (204,8  $\mu\text{M}$ ) byla vybrána na základě RTCA testu (obr. 17, 18 a 19), jako nejnižší plně účinná koncentrace.

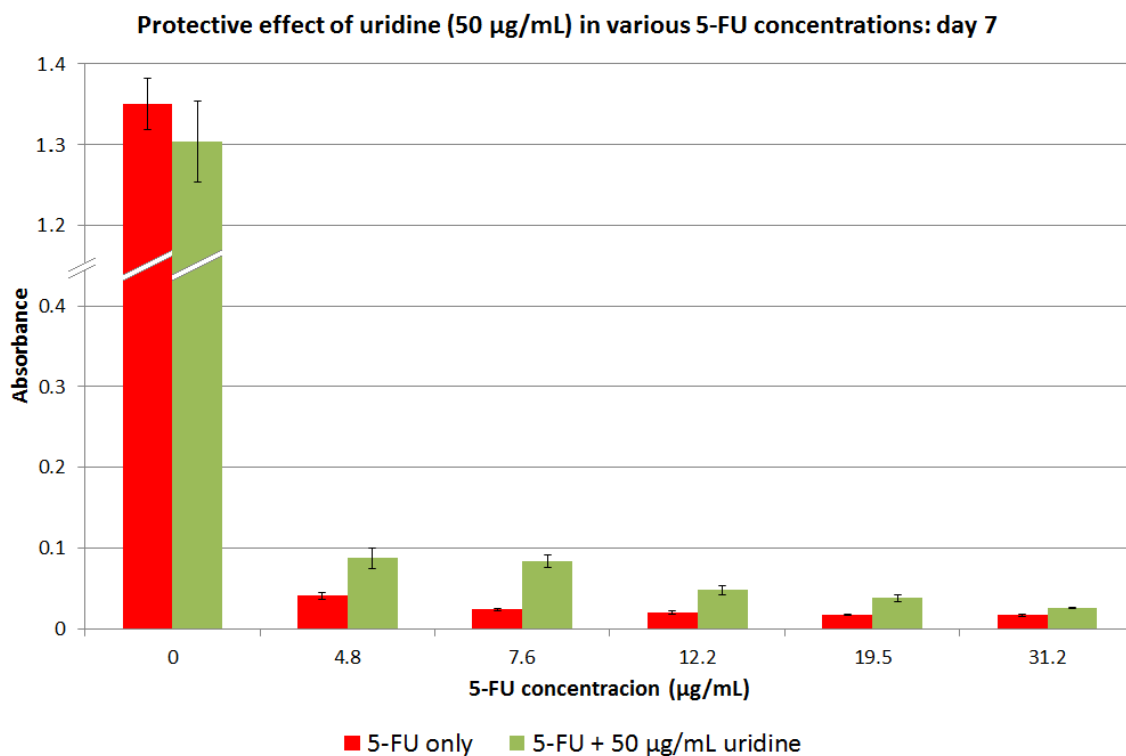


Graf 7. MTT test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Protektivní účinek 50 µg/mL (204,8 µM) uridinu při různých koncentracích 5-FU po dvou dnech kultivace (nepublikovaná data).



Graf 8. MTT test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Protektivní účinek 50 µg/mL (204,8 µM) uridinu při různých koncentracích 5-FU po čtyřech dnech kultivace (nepublikovaná data).

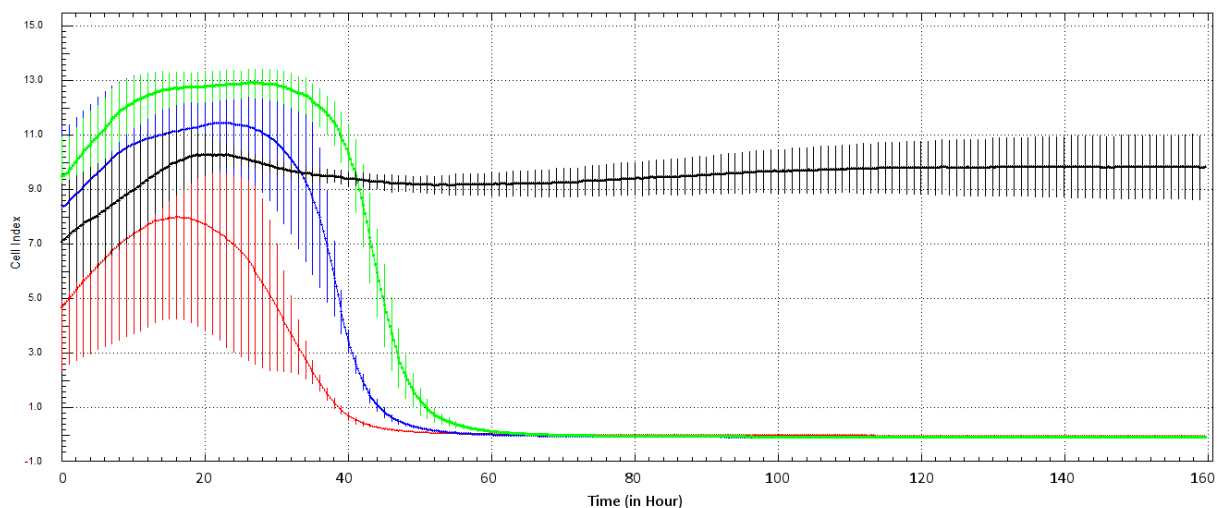




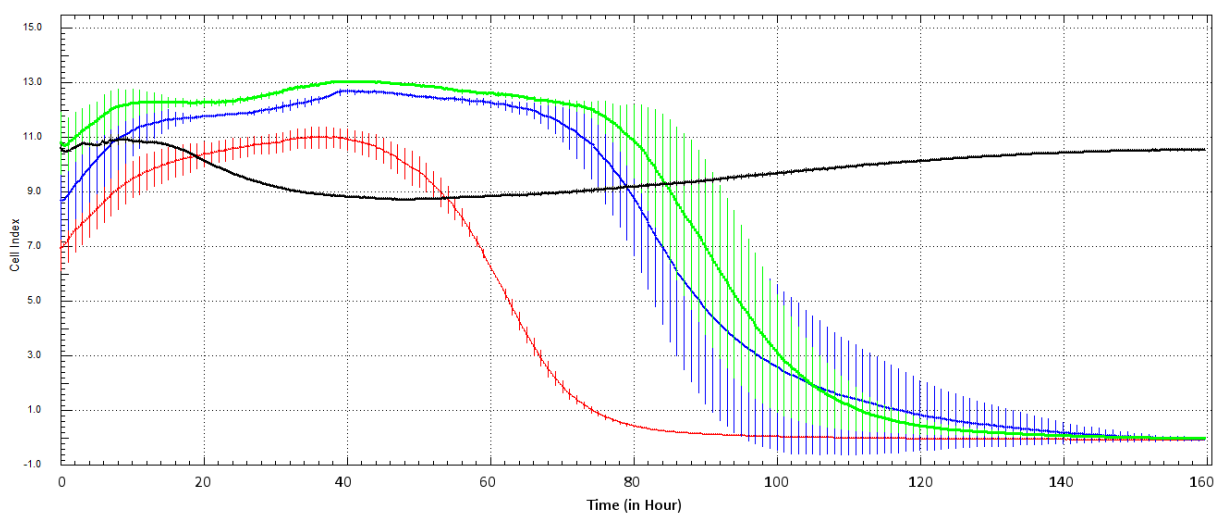
*Graf 9. MTT test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Protektivní účinek 50 µg/mL (204,8 µM) uridinu při různých koncentracích 5-FU po sedmi dnech kultivace (nepublikovaná data).*

Výsledky MTT testu neprokázaly po dvou dnech kultivace (graf 7) protektivní účinek uridinu, neboť nedošlo k plnému rozvoji toxicity 5-FU (kontrolní buňky metabolisovaly pouze nepatrně více, než buňky s 5-FU), což je ve shodě s většinou předchozích výsledků, které potvrzují, že toxicita 5-FU se projevuje v průměru až po dvou dnech. Čtvrtý den byly rozdíly nejmarkantnější (graf 8). Pokud nebyl přidán do média uridin, toxicita 5-FU stoupala se vzrůstající koncentrací 5-FU. Buňky s uridinem nevykazovaly tuto tendenci a až do nejvyšší koncentrace 5-FU (31,2 µg/mL, 240 µM) si zachovaly metabolickou aktivitu, která nebyla významně odlišná od hodnot ze druhého dne (srovnej grafy 7 a 8). Tyto výsledky potvrzují, že uridin snížil projevy toxicity 5-FU čtvrtý den kultivace ve všech koncentracích 5-FU. Sedmý den byl stále mírný doznívající protektivní účinek uridinu patrný, nicméně buňky byly již téměř mrtvé (absorbance < 0,1, graf 9).

V RTCA testu byla porovnána toxicita 5-FU v koncentraci 6,25 µg/mL (48 µM), 12,5 µg/mL (96 µM) a 25,0 µg/mL (192 µM) bez přítomnosti uridinu (graf 10) a v přítomnosti 50 µg/mL (205 µM) uridinu (graf 11).



Graf 10. RTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Toxicita různých koncentrací 5-FU: ■ - 25,0 µg/mL (192 µM), ■ - 12,5 µg/mL (96 µM) a ■ - 6,3 µg/mL (48 µM), ■ - kontrola (nepublikovaná data).



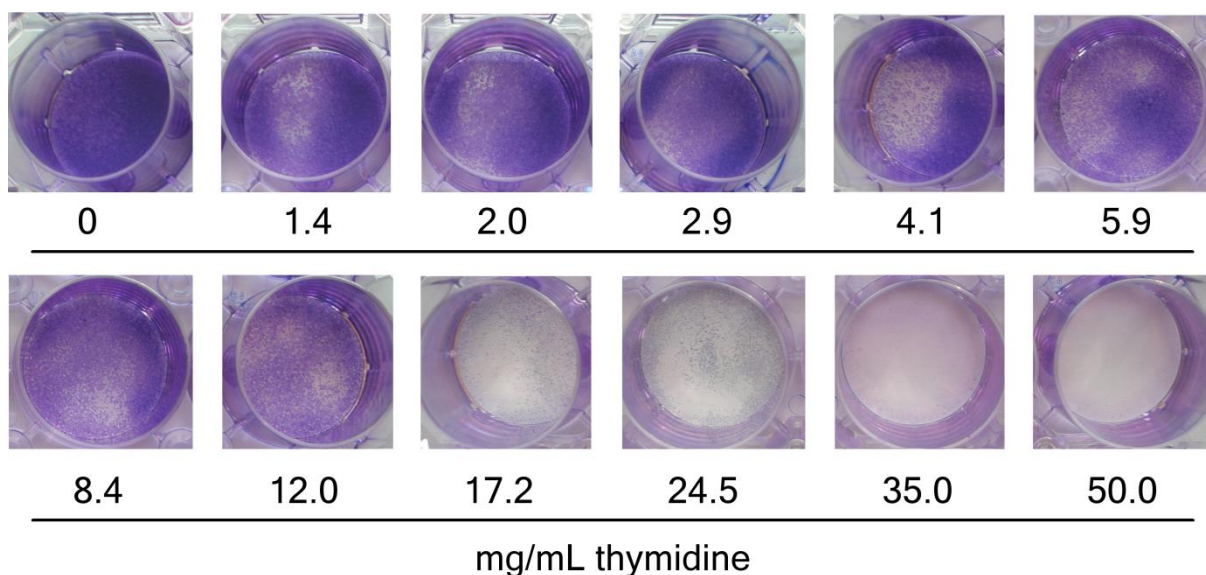
Graf 11. RTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Toxicita různých koncentrací 5-FU: ■ - 25,0 µg/mL (192 µM), ■ - 12,5 µg/mL (96 µM) a ■ - 6,3 µg/mL (48 µM), ■ - kontrola. Ve všech jamkách bylo přítomno 50 µg/mL uridinu (204,8 µM) (nepublikovaná data).

V přítomnosti 6,3 µg/mL (48 µM) a 12,5 µg/mL (96 µM) 5-FU přežívají buňky s uridinem o cca 2 dny déle (celkem cca 90 hodin, graf 11), než bez přítomnosti uridinu (celkem cca 40 hodin, graf 10). Prodloužení přežití o celkem 2 dny v přítomnosti uridinu bylo koherentně prokazováno ve všech dalších RTCA testech ve kterých se účinnost uridinu měřila. Další prodloužení přežití nenastalo, ani

pokud byla použita dvojnásobná koncentrace uridinu (100 µg/mL, 410 µM, grafy 13, 23 a 25). V přítomnosti 25,0 µg/mL (192,3 µM) 5-FU přežívají buňky s uridinem pouze o cca 30 hodin déle (celkem cca 70 hodin, graf 11), než bez přítomnosti uridinu (celkem cca 40 hodin, graf 10), přičemž 50 µg/mL uridinu (205 µM) je téměř equimolární s 25 µg/mL 5-FU (192,3 µM). Zdá se, tedy, že koncentrace uridinu by měla být vyšší, než equimolární ke koncentraci 5-FU.

## 5.4.Toxicita thymidinu

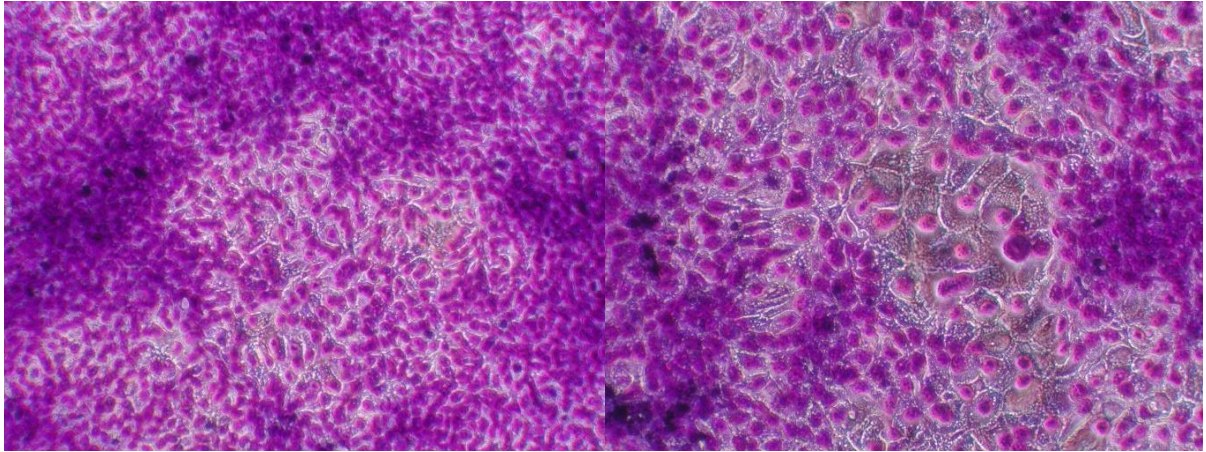
Toxicita thymidinu byla zjišťována pomocí NTCA testu obdobným způsobem jako v případě uridinu.



Obrázek 20. NTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Nárůst buněk na platech s různou koncentrací thymidinu. Buňky byly obarveny po 3 dnech působení thymidinu (nepublikovaná data).

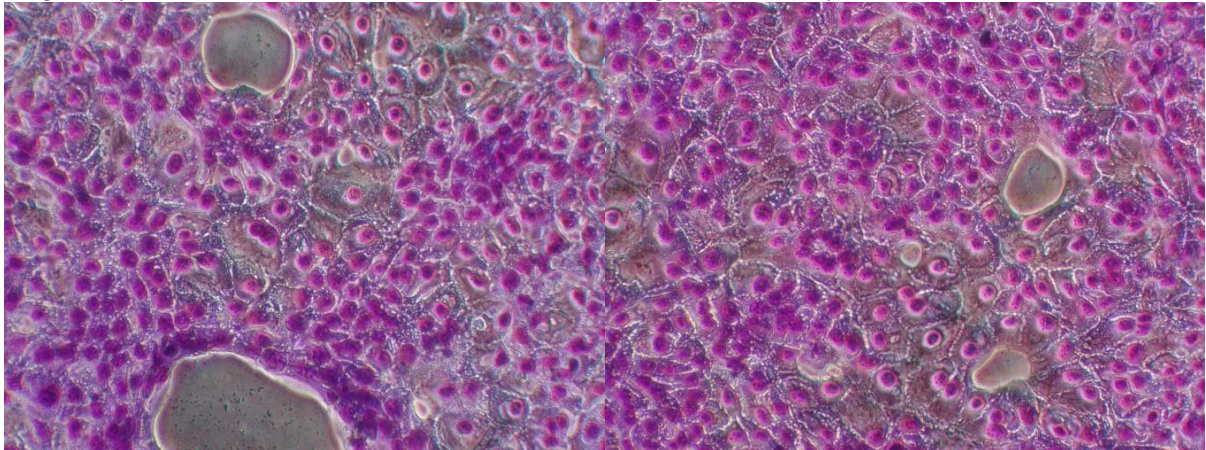
Z obrázku 20 je patrné, že toxicita thymidinu je vyšší, než toxicita uridinu a jednoznačně se projevuje již při koncentraci 17,2 mg/mL (70,8 mM). Na mikrofotografiích (obr. 21) jsou patrné ojedinělé toxické projevy již při nižších koncentracích (5,8 mg/mL (23,9 mM) a 8,4 mg/mL (34,7 mM)).





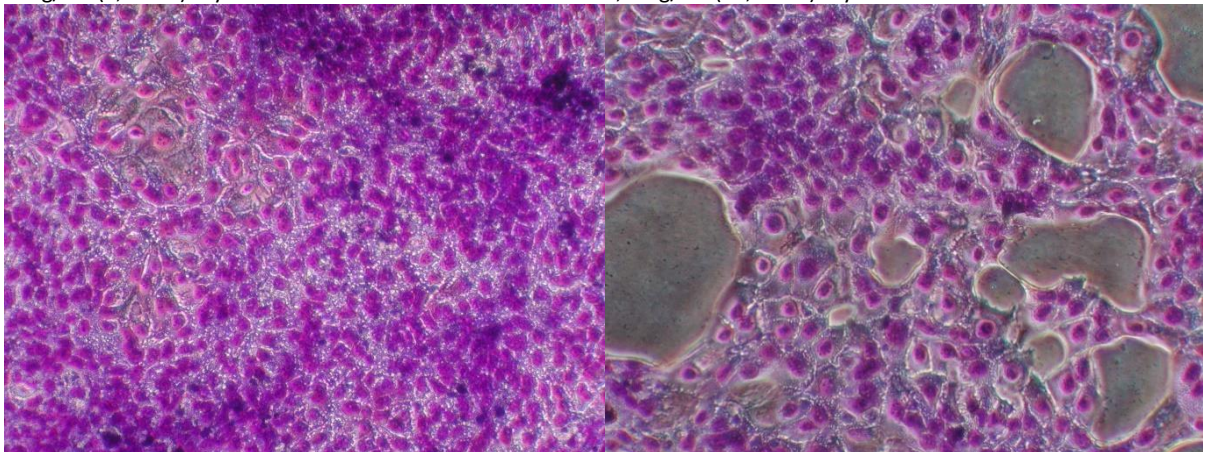
0 mg/mL thymidinu

1,4 mg/mL (5,7 mM) thymidinu



2 mg/mL (8,3 mM) thymidinu

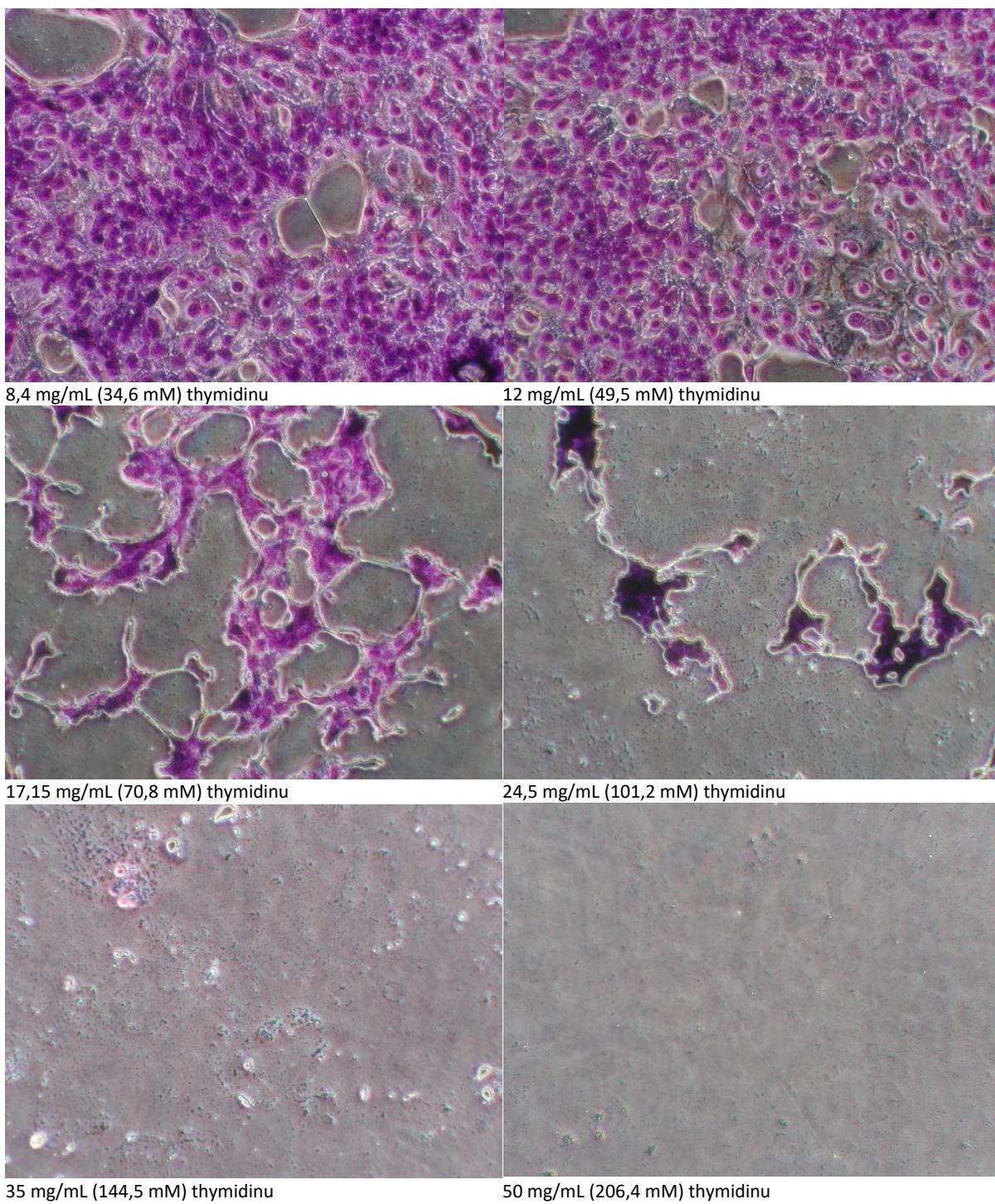
2,8 mg/mL (11,6 mM) thymidinu



4,1 mg/mL(16,9 mM) thymidinu

5,8 mg/mL (23,9 mM) thymidinu

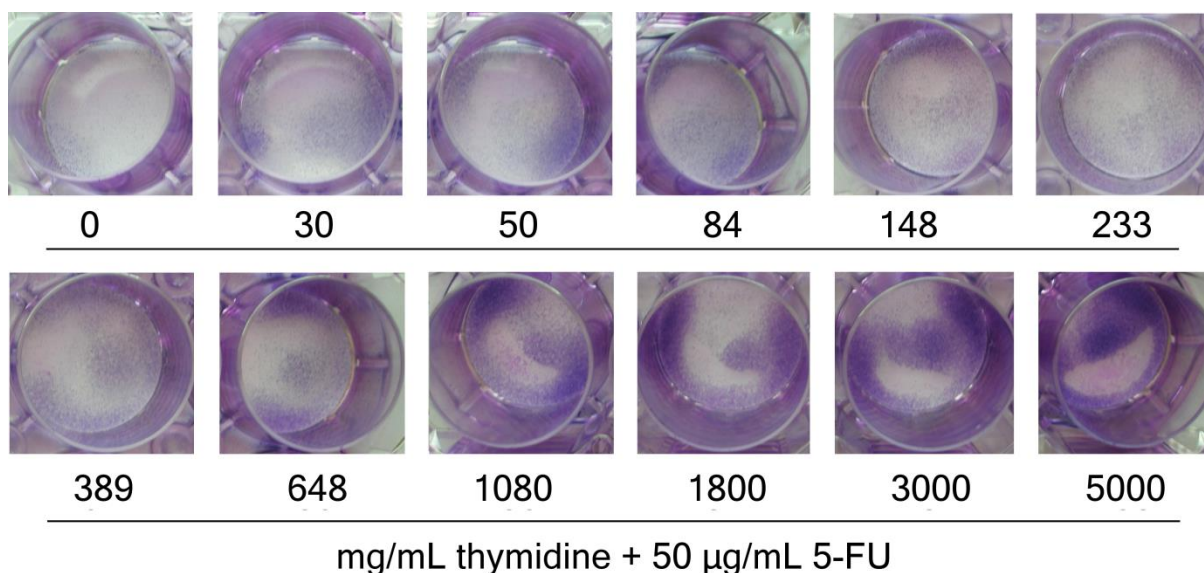




Obrázek č. 21. 100x zvětšené mikrofotografie HaCaT keratinocytů. Toxicita thymidinu v jeho různých koncentracích. Buňky byly obarveny po 3 dnech působení thymidinu (nepublikovaná data).

## 5.5. Protektivní účinek thymidinu na buňky v přítomnosti 5-FU

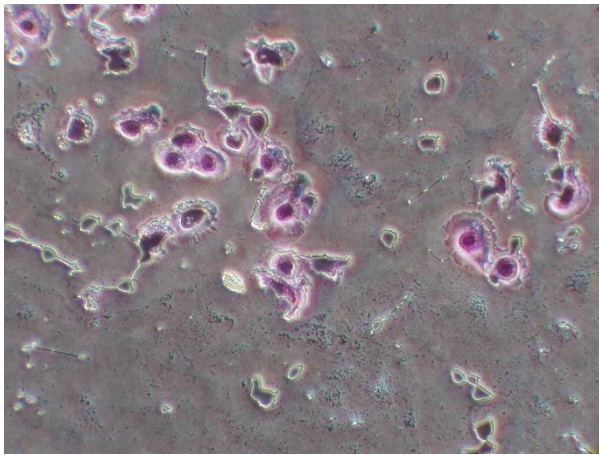
### 5.5.1. Minimální protektivní koncentrace thymidinu v přítomnosti 5-FU



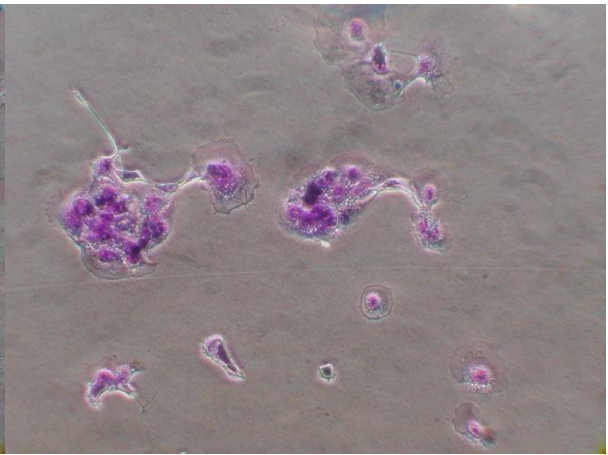
Obrázek 22. NTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Nárůst buněk na platech s různou koncentrací thymidinu v přítomnosti 50 µg/mL (205 µM) 5-FU. Buňky byly obarveny po 3 dnech působení 5-FU a thymidinu. Srpký při vyšších koncentracích jsou artefakty vzniklé při barvení (nepublikovaná data).

Z obr. 22 je patrné, že thymidin vykazuje výrazně menší protektivní účinek, než uridin. Protektivní efekt je patrný až ve vysokých koncentracích kolem 1 mg/mL (4,13 mM, obr. 22 a 23). V koncentracích okolo 3 mg/mL (12,4 mM) je však protektivní efekt již srovnatelný s 50 µg/mL (204,8 µM) uridinu (viz obr. 17 a 18).

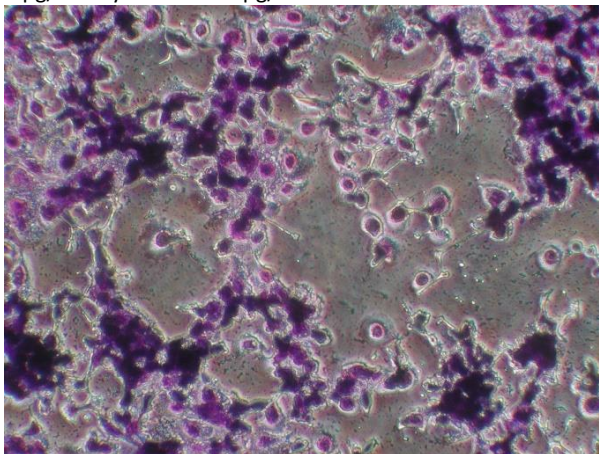




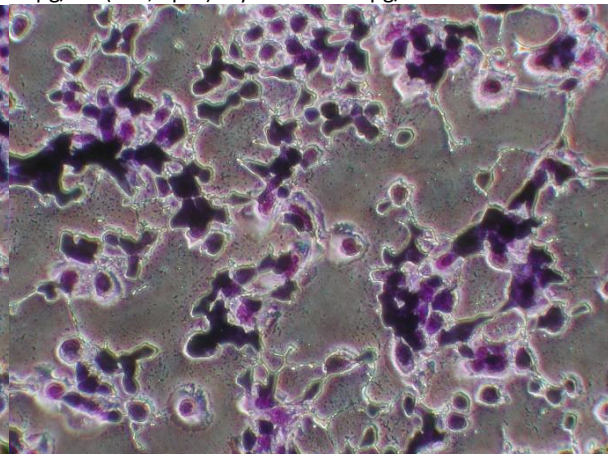
0 µg/mL thymidinu + 50 µg/mL 5-FU



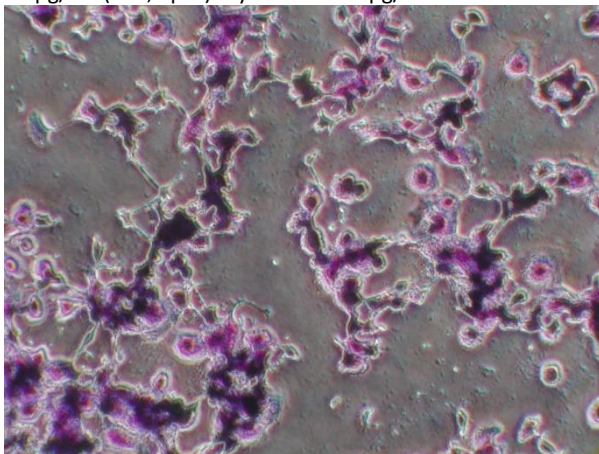
30 µg/mL (123,9 µM) thymidinu + 50 µg/mL 5-FU



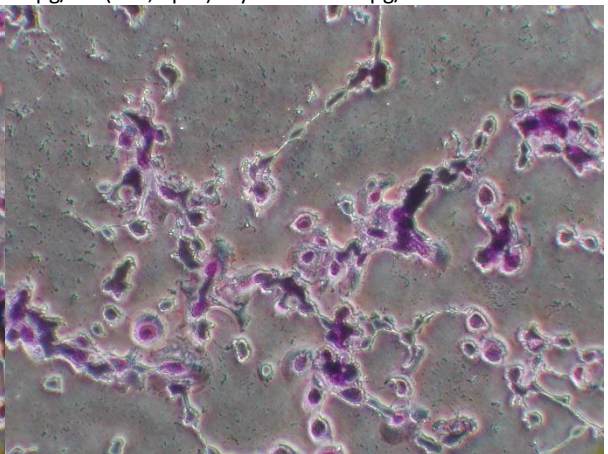
50 µg/mL (206,4 µM) thymidinu + 50 µg/mL 5-FU



84 µg/mL (346,8 µM) thymidinu + 50 µg/mL 5-FU

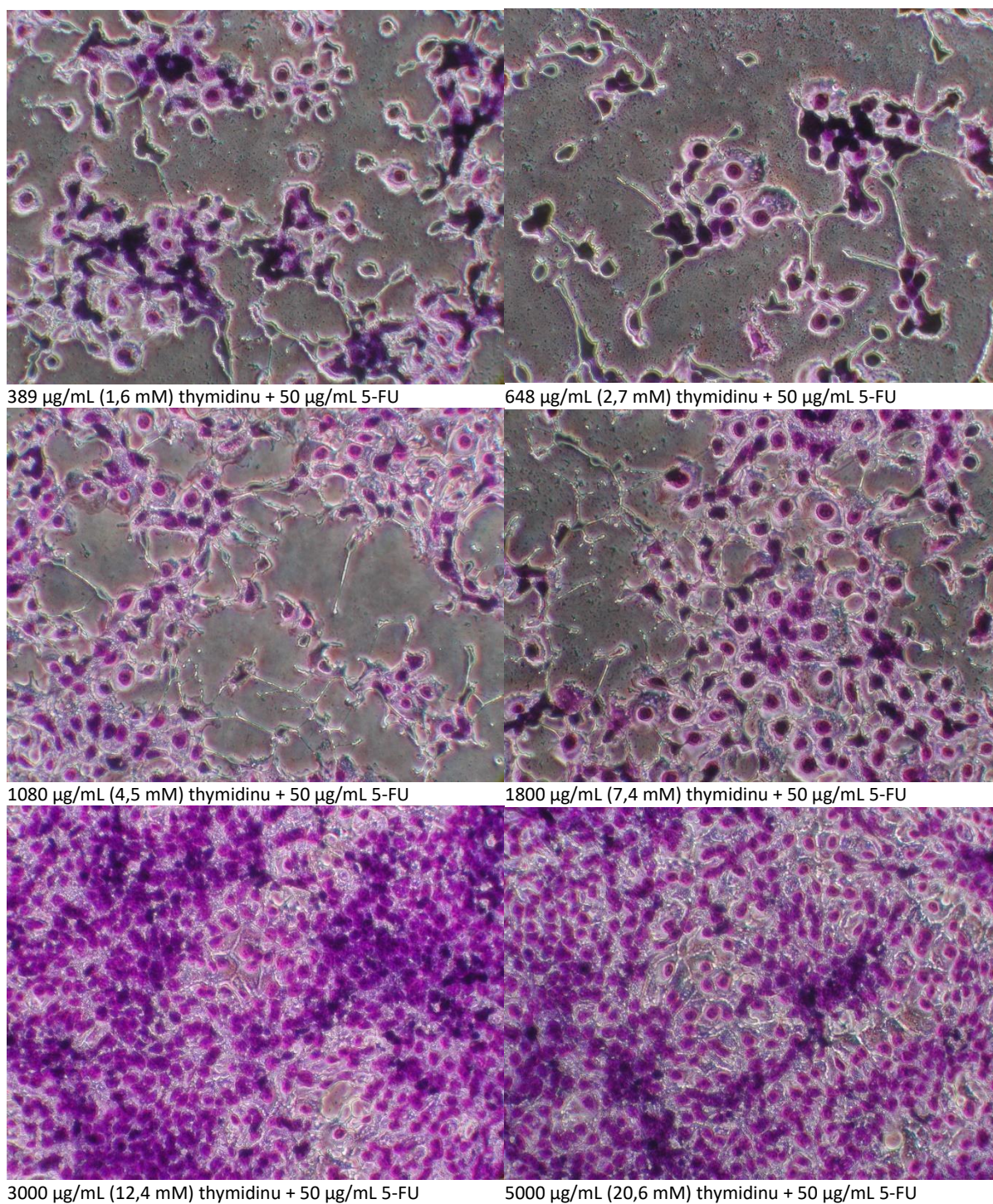


148 µg/mL (611,1 µM) thymidinu + 50 µg/mL 5-FU



233 µg/mL (962,0 µM) thymidinu + 50 µg/mL 5-FU



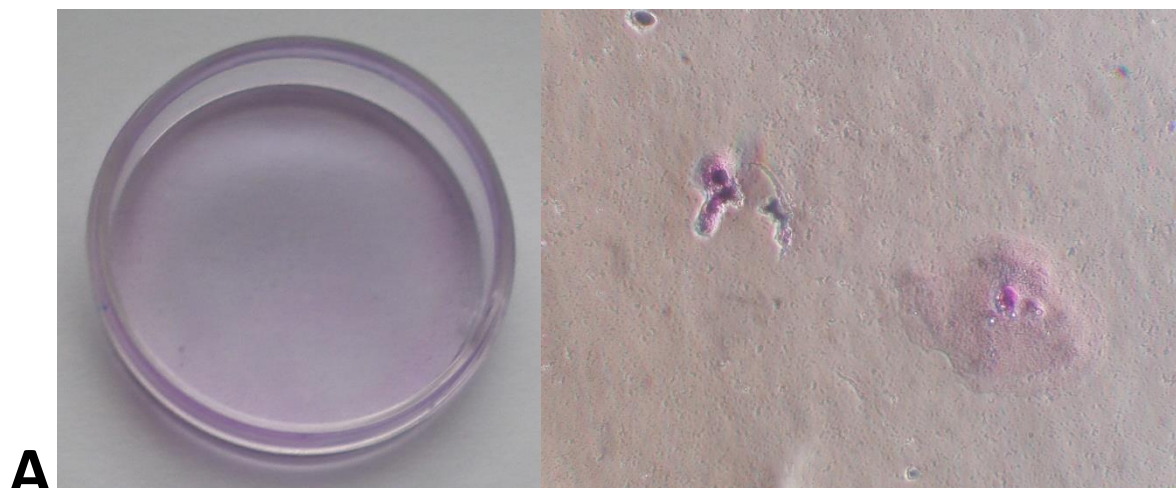


*Obrázek 23. Srovnání mikrofotografií (100 x zvětšené) buněk ošetřených různými koncentracemi thymidinu v přítomnosti 50  $\mu\text{g/mL}$  5-FU (384,6  $\mu\text{M}$ ). Buňky byly obarveny po 3 dnech působení 5-FU a thymidinu (nepublikovaná data).*

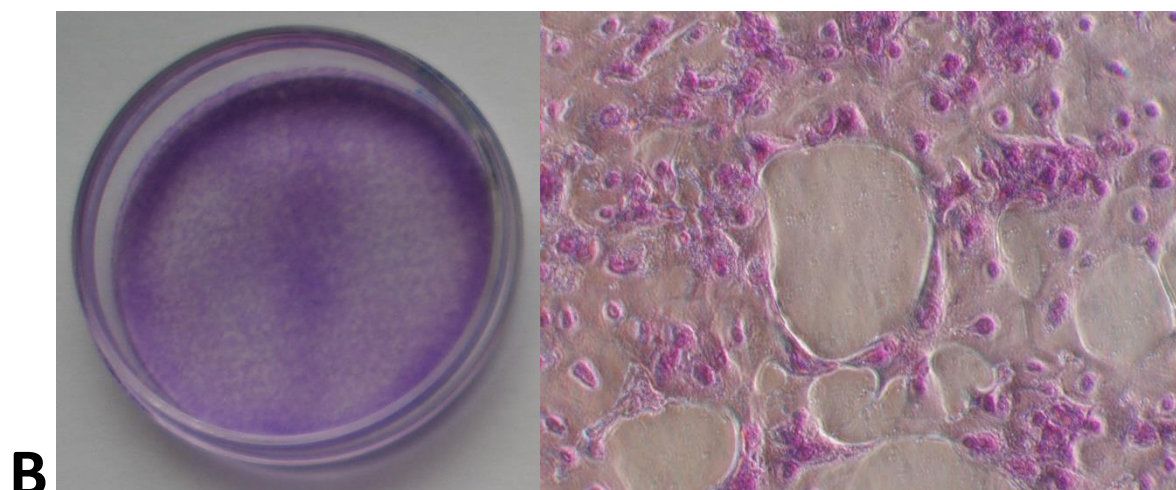


## 5.6. Porovnání protektivního účinku uridinu samotného a thymidinu samotného

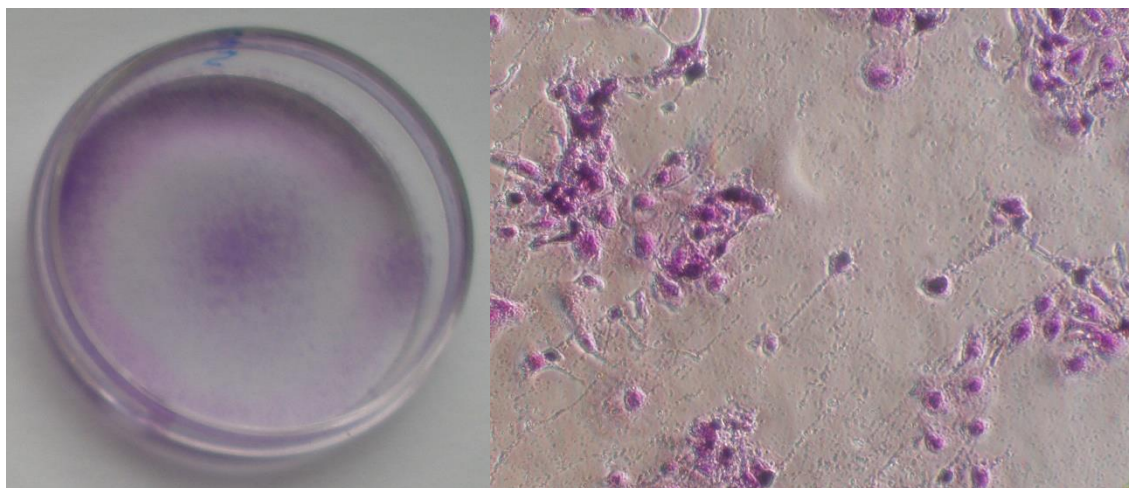
Pro zjištění rozdílu mezi účinkem samotného thymidinu a samotného uridinu bylo provedeno několik testů (obr. 24, grafy 13 a 14).



5-FU (7,5  $\mu\text{g/mL}$ , 31,0  $\mu\text{M}$ )



5-FU (7,5  $\mu\text{g/mL}$ , 31,0  $\mu\text{M}$ ) + uridin (100  $\mu\text{g/mL}$ , 409,5  $\mu\text{M}$ )

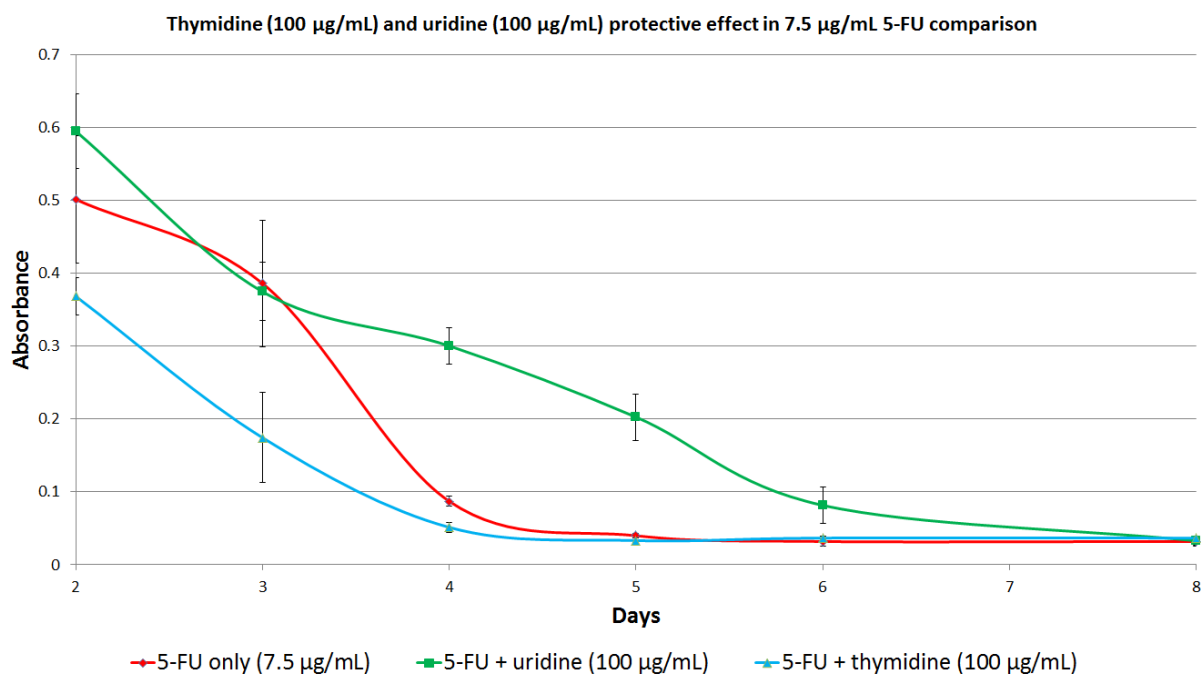
**C**

5-FU (7,5 µg/mL, 31,0 µM) + thymidin (100 µg/mL, 412,9 µM)

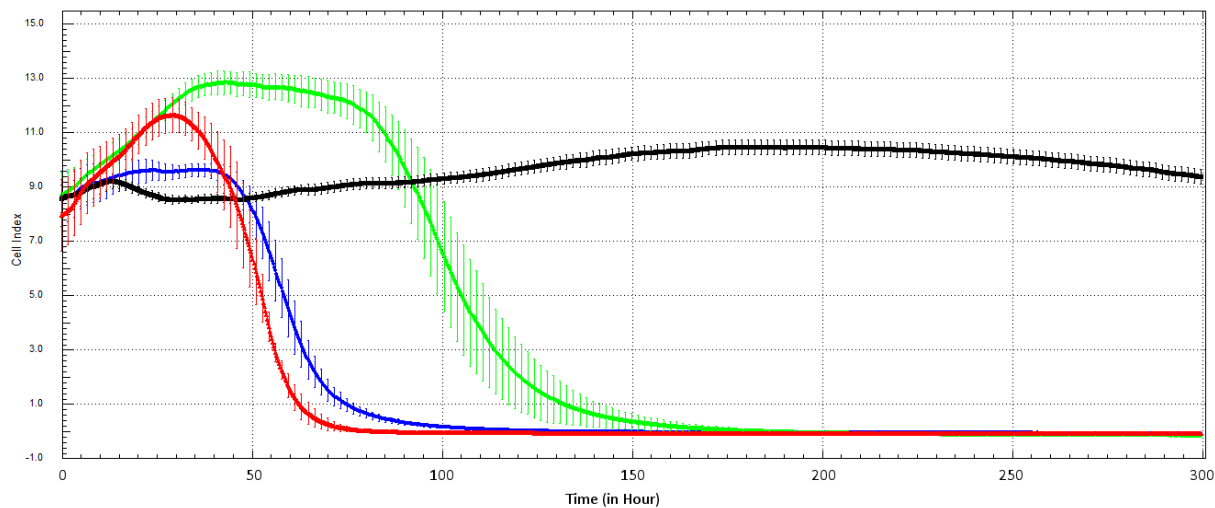
**D**

Kontrolní buňky bez 5-FU a nukleosidů

*Obrázek 24. Fotografie Petriho misek a mikrofotografie (100 x zvětšené). Porovnání nárůstu buněk kultivovaných 5 dní v koncentraci 7,5 µg/mL (31,0 µM) 5-FU bez dalších látek (A) a 5-FU v kombinaci s uridinem (100 µg/mL (409,5 µM), B), nebo thymidinem (100 µg/mL (412,9 µM), C). D = kontrolní buňky kultivované bez 5-FU a nukleosidů (Hartinger et al. 2015).*



Graf 12. MTT test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Porovnání metabolické aktivity buněk kultivovaných 8 dní v koncentraci 7,5 µg/mL (31,0 µM) 5-FU a (100 µg/mL, 409,5 µM) uridinu, nebo (100 µg/mL, 412,9 µM) thymidinu. Kontrola nezobrazena – jamky kontrolních buněk vykazovaly v průběhu celého pokusu absorbanci > 1,0 (nepublikovaná data).

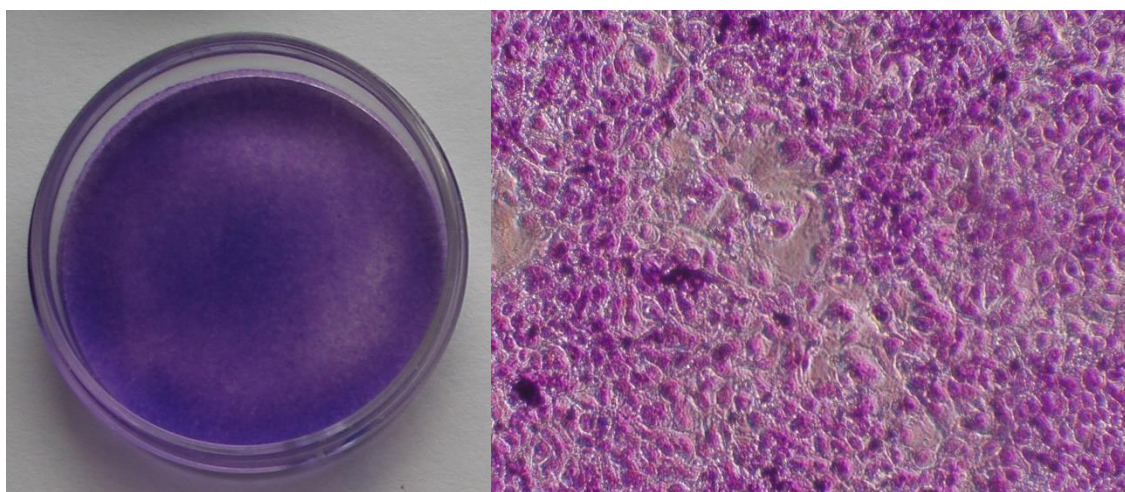


Graf 13. RTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. ■ - pouze 7,5 µg/mL (31,0 µM) 5-FU, ■ - 5-FU + 100 µg/mL (412,9 µM) thymidinu, ■ - 5-FU + 100 µg/mL (409,5 µM) uridinu, ■ - kontrola (nepublikovaná data).



Bylo zjištěno, že buňky, na které působí 7,5 µg/mL (31,0 µM) 5-FU nepřežívají v přítomnosti 100 µg/mL (412,9 µM) thymidinu déle, než buňky bez jakýchkoliv protektivních látek (ve shodě s předchozím pokusem – obr. 22 a 23, kde však byla použita koncentrace 5-FU 50 µg/mL (384,6 µM)). Uridin v koncentraci 100 µg/mL (409,5 µM) ve shodě s předchozími pokusy prodlužoval přežití buněk o cca 2 dny (obrázek 24, grafy 12 a 13). Zajímavé zjištění bylo, že v RTCA testu nedosáhnou buňky s thymidinem tak vysokých hodnot cell indexu, jako buňky, v jejichž médiu je pouze 5-FU, nebo 5-FU s uridinem. Stejný „nízký“ průběh křivky cell indexu byl zaznamenán i v případě kontrolních buněk. Thymidin může tento jev způsobovat zábranou proliferace buněk (Xeros 1962), nicméně proti tomuto vysvětlení svědčí podobný průběh u kontrolních buněk. Zdá se tedy, že nárůst cell indexu u buněk, v jejichž médiu je pouze 5-FU, nebo 5-FU a uridin je projevem stresu, kterému je thymidinem zabráněno i když sám o sobě neprodukuje přežívání buněk.

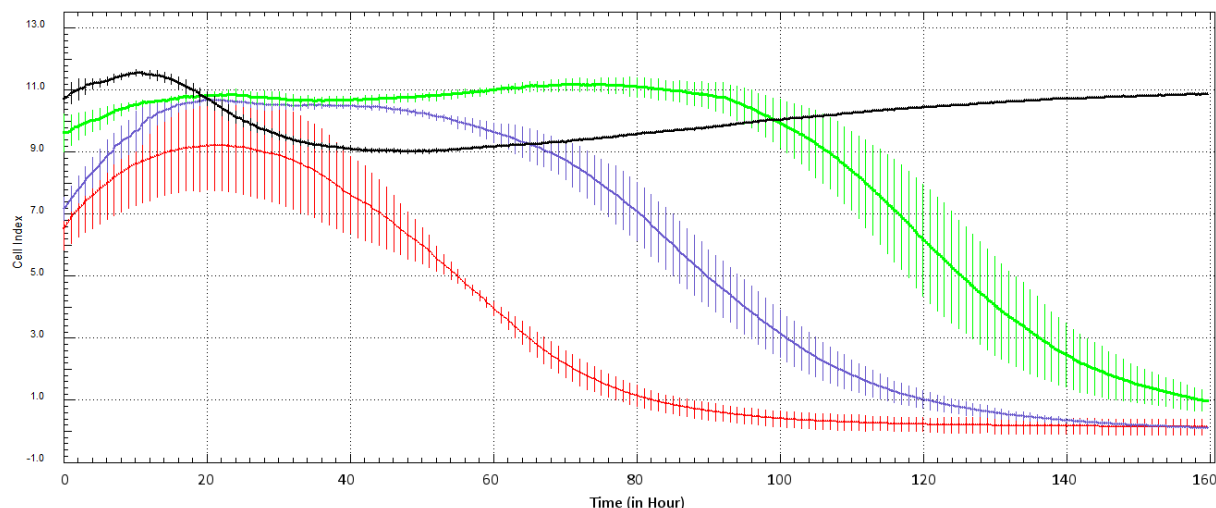
### 5.7. Protektivní efekt kombinace uridinu a thymidinu



*Obrázek 25. Fotografie Petriho misky a mikrofotografie (100 x zvětšená), ketarinocyty buněčné linie HaCaT. Porovnání nárůstu buněk kultivovaných 5 dní v koncentraci 7,5 µg/mL (31,0 µM) 5-FU a uridinu (50 µg/mL, 204,8 µM) a thymidinu (50 µg/mL, 206,4 µM) (Hartinger et al. 2015).*

Na rozdíl od buněk, v jejichž médiu byl 5-FU a 100 µg/mL (409,5 µM) uridinu, nebo 100 µg/mL (412,9 µM) thymidinu (obr. 24, B, C) přežívaly buňky s kombinací těchto nukleosidů v poloviční koncentraci (obr. 25) do pátého dne stejně jako kontrolní buňky bez 5-FU a bez nukleosidů (obr. 24, D). Thymidin i uridin byly v kultivačním médiu v koncentracích 50 µg/mL (206,4 µM, resp. 204,8 µM),

celková koncentrace nukleosidů tedy byla přibližně stejná, jako v pokusech se samostatnými nukleosidy. Výsledný efekt tedy nelze přičítat nespecifickému vlivu vyšší koncentrace nukleosidů.



Graf 14. RTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Koncentrace 5-FU: ■ - 25,0 µg/mL (192 µM), ■ - 12,5 µg/mL (96 µM) a ■ - 6,3 µg/mL (48 µM), ■ - kontrola. Ve všech jamkách bylo přítomno 25 µg/mL (102 µM) uridinu a 25 µg/mL (103 µM) thymidinu (nepublikovaná data).

Dále byl proveden RTCA test pro zjištění efektu koncentrace 25 µg/mL (102 µM) uridinu a 25 µg/mL (103 µM) thymidinu v různých koncentracích 5-FU (graf. 14). Na rozdíl od pokusu s 50 µg/mL uridinu

Uridin (µg/mL)	Thymidin (µg/mL)
25 (102,4 µM)	25 (103,2 µM)
50 (204,8 µM)	50 (206,4 µM)
50 (204,8 µM)	75 (309,7 µM)
25 (102,4 µM)	50 (206,4 µM)
50 (204,8 µM)	25 (103,2 µM)

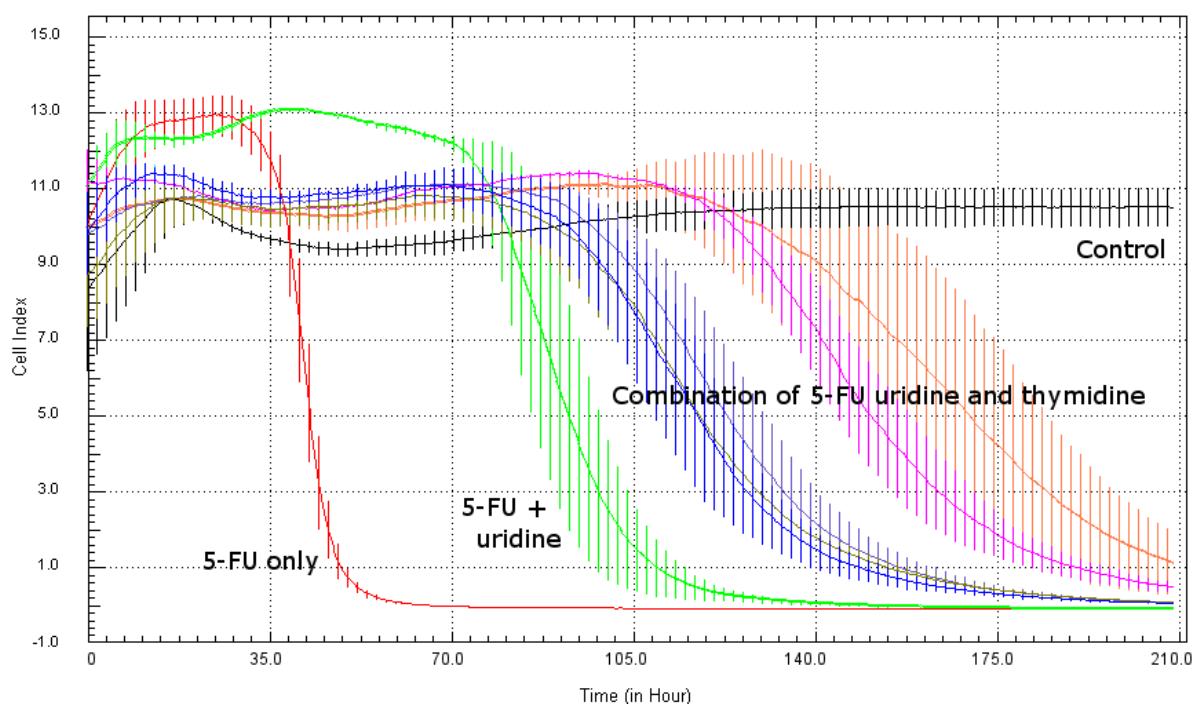
Tabulka 1. Testované koncentrace thymidinu a uridinu při ověřování nejúčinnější protektivní kombinace.

samotného (204,8 µM, graf 11, stejná celková koncentrace nukleosidů) došlo k dalšímu prodloužení přežívání buněk v nejnižší koncentraci (6,3 µg/mL, 48 µM) 5-FU o cca 40 hodin a tím pádem k diferenciaci mezi koncentracemi 12,5 µg/mL (96 µM) a 6,3 µg/mL (48 µM) 5-FU, které byly v přítomnosti uridinu samotného stejně toxické (graf 11). V koncentracích 12,5 µg/mL (96 µM) a 25 µg/mL (192 µM) nebyl efekt thymidinu patrný (stejný průběh křivek jako s uridinem samotným – viz rovněž graf 16).

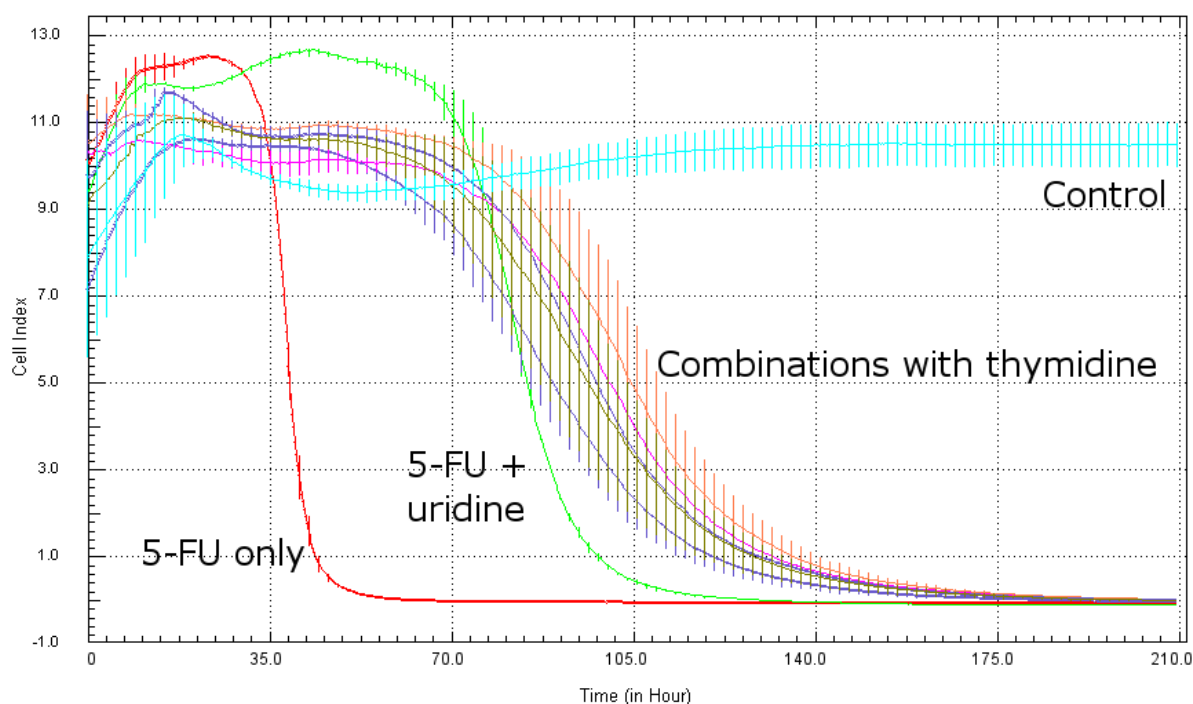
Za účelem zjištění nejvhodnějšího poměru koncentrací uridinu a thymidinu byly v RTCA testu testovány různé poměry koncentrací uvedené v tabulce 1.

Buňky v přítomnosti různých poměrů koncentrací uridinu a thymidinu přežívaly při koncentraci 6,3  $\mu\text{g/mL}$  (49  $\mu\text{M}$ ) 5-FU vždy déle, než v přítomnosti 50  $\mu\text{g/mL}$  (204,8  $\mu\text{M}$ ) uridinu samotného. Graf č. 15 znázorňuje efekt různých poměrů koncentrací uridinu a thymidinu (viz tab. 1) na přežití buněk v přítomnosti 6,3  $\mu\text{g/mL}$  (49  $\mu\text{M}$ ) 5-FU. V koncentraci 5-FU 6,3  $\mu\text{g/mL}$  (49  $\mu\text{M}$ ) vykazovaly oproti ostatním kombinacím lepší protektivní efekt kombinace 50  $\mu\text{g/mL}$  uridinu a 50  $\mu\text{g/mL}$  thymidinu (cca o 12 hodin, fialová křivka) a 50  $\mu\text{g/mL}$  uridinu a 25  $\mu\text{g/mL}$  thymidinu (cca o 24 hodin, béžová křivka). Výsledky naznačují, že thymidin by neměl být přítomen ve vyšší koncentraci, než uridin (buď by měl být equimolární, nebo v nižší koncentraci) a že by pro plný rozvoj protektivního účinku měla být koncentrace uridinu více, než 2x vyšší, než koncentrace 5-FU, což je ve shodě s předchozími výsledky (graf 11). Obdobné výsledky jsou patrné i v grafu 26, který je pro názornost porovnání protektivního účinku cytidinu a uridinu znázorněn na jiném místě níže v textu.

V dvojnásobné koncentraci 5-FU nebyl účinek thymidinu na délku přežívání buněk vyjádřen (graf 16). Byl pouze zachován nižší nárůst cell indexu po přidání 5-FU do média. Další výsledky z MTT testů však ukazují, že eventuálním dalším navýšením koncentrace protektivních nukleosidů by bylo možno přežití buněk prodloužit. Pravděpodobně však bez zachování synergického efektu thymidinu (graf 18).

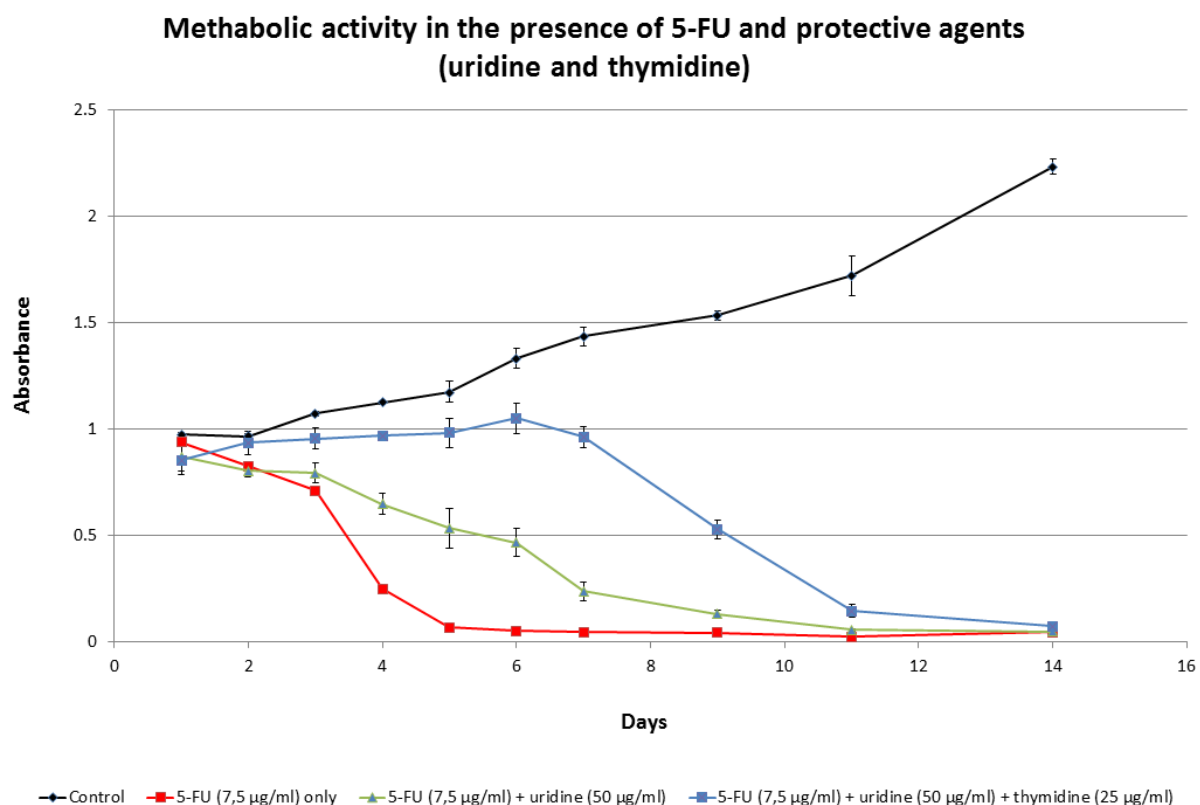


Graf 15. RTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Koncentrace 5-FU 6,3  $\mu\text{g/mL}$  (48  $\mu\text{M}$ ):  
 ■ - pouze 5-FU, ■ - 5-FU + 50  $\mu\text{g/mL}$  uridinu (205  $\mu\text{M}$ ), ostatní barvy – 5-FU + různé kombinace uridinu a thymidinu (viz tab. 1), ■ - kontrola (nepublikovaná data).



Graf 16. RTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Koncentrace 5-FU 12,5  $\mu\text{g/mL}$  (96  $\mu\text{M}$ ):  
 ■ - pouze 5-FU, ■ - 5-FU + 50  $\mu\text{g/mL}$  uridinu (205  $\mu\text{M}$ ), ostatní barvy – 5-FU + různé kombinace uridinu a thymidinu (viz tab. 1), ■ - kontrola (nepublikovaná data).

Za účelem zjištění, jaký vliv má přidání thymidinu k uridinu byl rovněž proveden MTT test. Byla testována nejefektivnější kombinace nukleosidů (podle grafu 15), tedy 50  $\mu\text{g/mL}$  (204,8  $\mu\text{M}$ ) uridinu + 25  $\mu\text{g/mL}$  (103,2  $\mu\text{M}$ ) thymidinu v přítomnosti 7,5  $\mu\text{g/mL}$  5-FU (57,7  $\mu\text{M}$ , graf 17). Ve shodě s RTCA testem (graf 15) a NTCA testem (obr. 25) bylo v MTT testu zjištěno delší přežití a vyšší metabolisace buněk v kombinaci uridinu a thymidinu oproti buňkám s uridinem samotným. Tento rozdíl byl nejvíce patrný 6. a 7. den, kdy buňky s uridinem již téměř nevyvíjely metabolickou aktivitu, zatímco křivka vývoje metabolické aktivity buněk s uridinem a thymidinem téměř kopírovala křivku kontrolních buněk. Od 8. dne dochází k postupnému poklesu metabolické aktivity rovněž u buněk v kombinaci uridinu a thymidinu a 11. den jsou již všechny buňky, kromě kontroly, téměř mrtvé (graf 17).

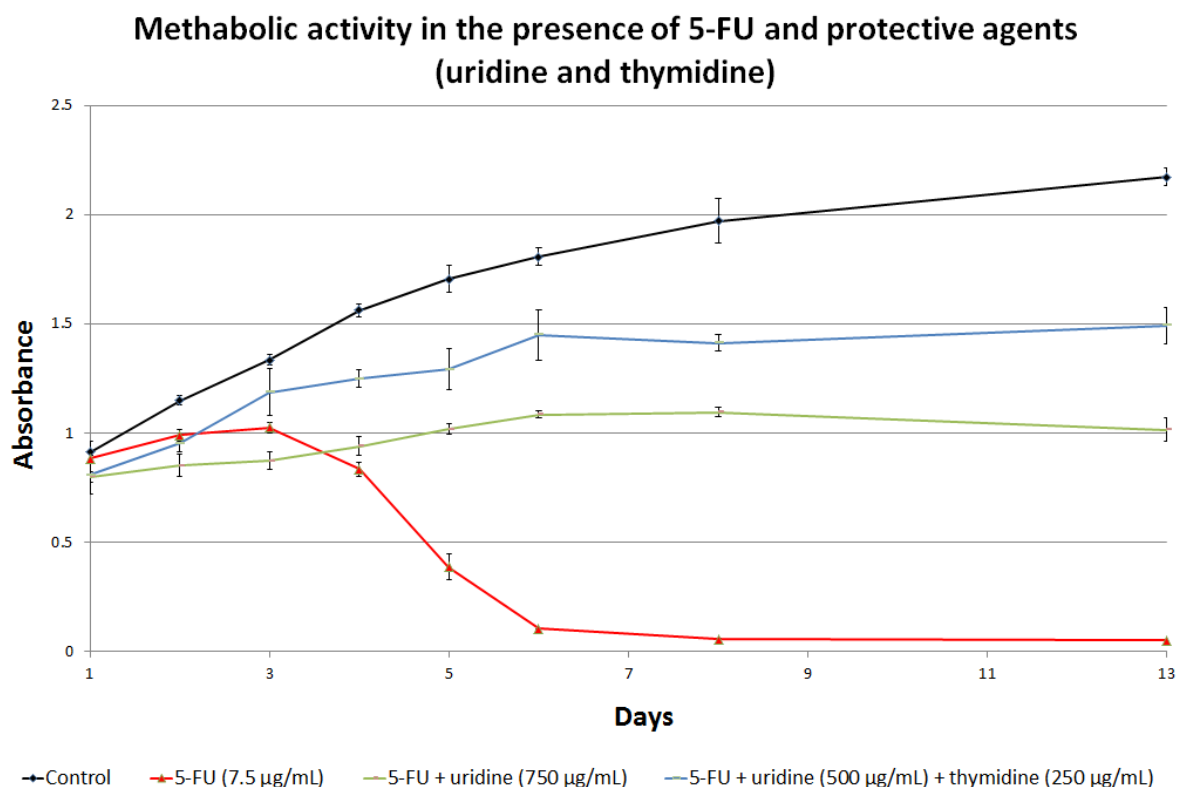


Graf 17. MTT test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Toxicita 5-FU (7,5 µg/mL, 57,7 µM) a protektivní efekt uridinu (50 µg/mL, 204,8), případně uridinu a thymidinu (50 µg/mL (204,8 µM) + 25 µg/mL (103,3 µM)) (nepublikovaná data).

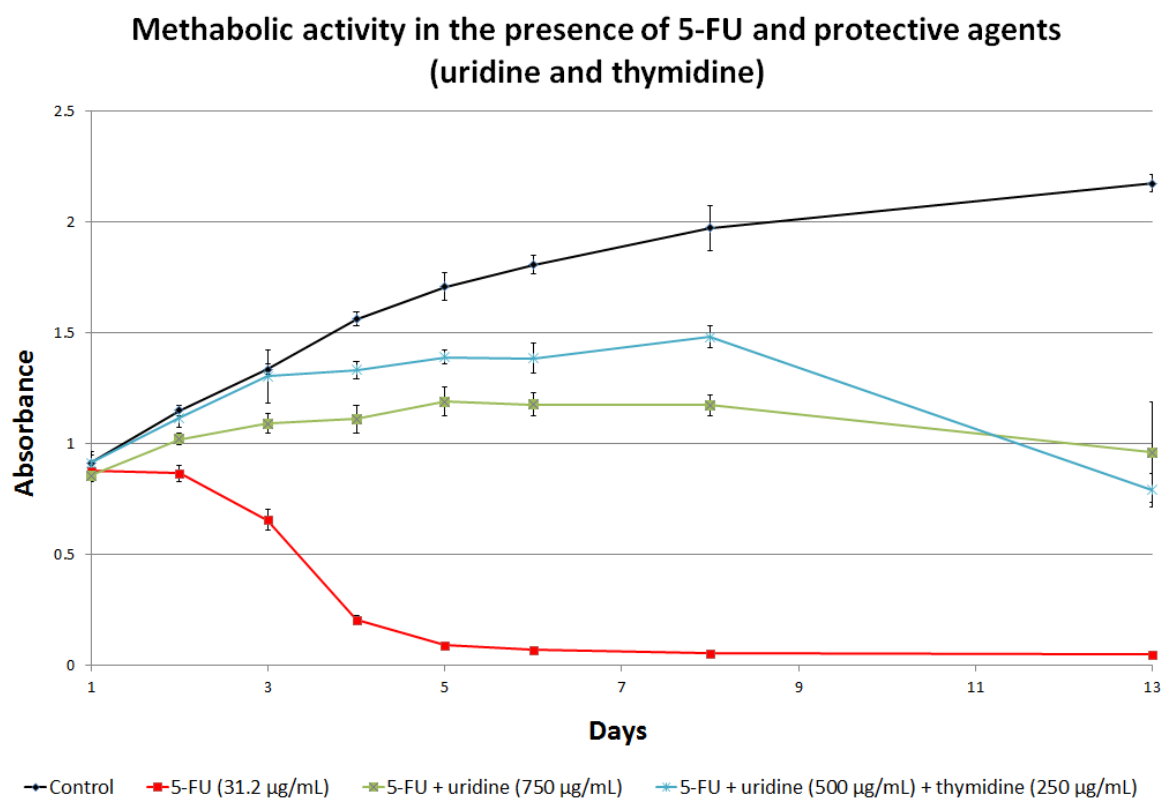
Také pokud byla použita 10x vyšší koncentrace protektivních agens byl protektivní efekt při koncentraci 7,5 µg/mL (57,7 µg/mL) 5-FU velmi zřetelný (graf 18). Buňky v kombinaci uridinu a thymidinu metabolisovaly o něco více, než buňky se samotným uridinem. Buňky s uridinem i s kombinací uridinu a thymidinu přežily do 13. dne bez poklesu metabolické aktivity, tedy déle, než při nižších koncentracích protektivních agens (graf 17). Velmi podobný výsledek byl zjištěn i v koncentraci 31,2 µg/mL (240 µM) 5-FU (graf 18). Dalším navyšováním protektivních látek tedy lze zvyšovat efekt při vyšších koncentracích 5-FU. Také bylo potvrzeno, že buňky s thymidinem metabolisují více, než buňky se samotným uridinem (v equimolární celkové koncentraci nukleosidů). K poklesu metabolisace v přítomnosti thymidinu došlo až 13. den a pouze v případě vyšší testované koncentrace 5-FU (graf 19). Vzhledem k izolovanému poklesu v poslední hladině bez předchozího trendu nelze vyloučit chybu měření.



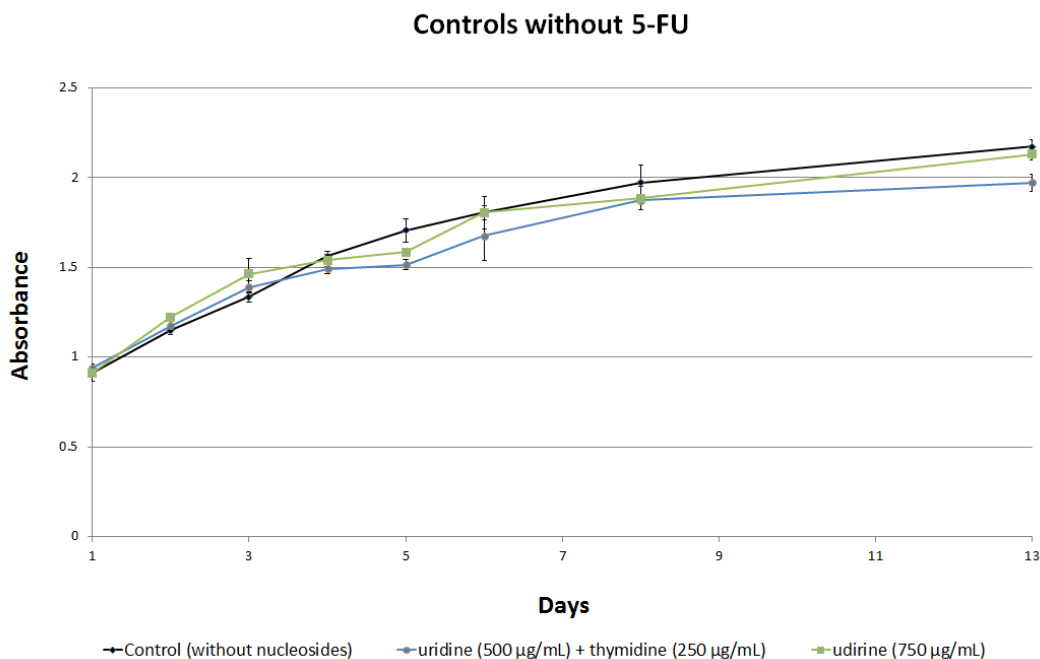
Pro vyloučení toxicity samotných protektivních agens bylo provedeno i kontrolní měření (graf 20), které vyloučilo toxicitu uridinu v koncentraci 750  $\mu\text{g/mL}$  (3 mM) a uridinu v kombinaci s thymidinem (500  $\mu\text{g/mL}$  (2,05 mM) a 250  $\mu\text{g/mL}$  (1,03 mM)).



Graf 18. MTT test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Toxicita 5-FU (7,5  $\mu\text{g/mL}$ , 57,7  $\mu\text{M}$ ) a protektivní efekt uridinu (750  $\mu\text{g/mL}$ , 3 mM), případně uridinu a thymidinu (500  $\mu\text{g/mL}$  (2,05 mM) a 250  $\mu\text{g/mL}$  (1,03 mM)) (nepublikovaná data).



Graf 19. MTT test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Toxicita 5-FU (31,2 µg/mL, 240 µM) a protektivní efekt uridinu (750 µg/mL, 3 mM), případně uridinu a thymidinu (500 µg/mL (2,05 mM) a 250 µg/mL (1,03 mM)) (nepublikovaná data).



*Graf 20. MTT test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Kontrolní buňky v koncentraci 750 µg/mL (3 mM) uridinu, případně 500 µg/mL (2,05 mM) uridinu a 250 µg/mL (1,03 mM) thymidinu bez 5-FU nevykazovaly pokles v metabolické aktivitě, oproti buňkám bez nukleosidů (nepublikovaná data).*

## 5.8. Kalciumfolinát

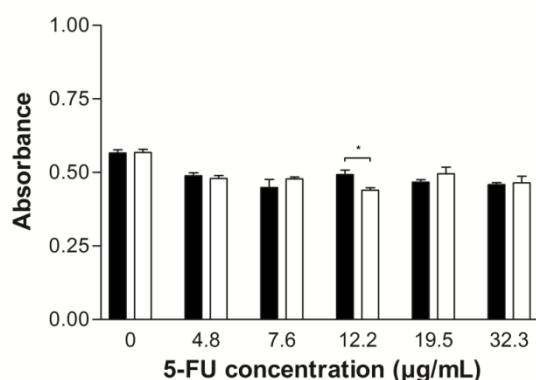
Vliv kalciumfolinátu na buňky v přítomnosti 5-FU byl zkoumán pomocí MTT testu (grafy 21-23) po 2, 4 a 7 dnech kultivace.

Přestože kalciumfolinát byl na buňky aplikován v koncentraci 2x vyšší, než je popisovaná maximální plasmatická koncentrace u pacientů léčených bolusem 500 mg/m<sup>2</sup> (Trave et al. 1988), nevedlo přidání kalciumfolinátu k buňkám s 5-FU ke zvýšení toxicity 5-FU ani 2. (graf 21A), ani 4. (graf 21B) den, což ukazuje, že inhibice TS není primární mechanismus účinku 5-FU u HaCaT keratinocytů. 7. den buňky v žádné koncentraci 5-FU nepřežily (výsledky nejsou presentovány).

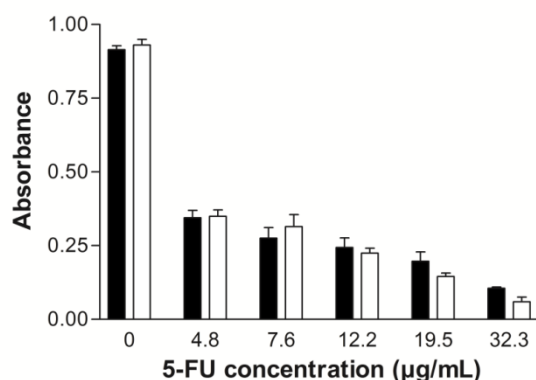
V případě přidání uridinu (50 µg/mL, 204,8 µM) do média buněk stresovaných 5-FU došlo k potlačení toxicity 5-FU (graf 22). Pokud byl k buňkám s uridinem dále přidán kalciumfolinát v koncentraci 20 µg/mL (42,2 µM), došlo k oslabení protektivního účinku uridinu a posílení toxicity 5-FU jak 2. den (graf 22A), tak 4. den (graf 22B). Tento výsledek byl statisticky významný (nespárovaný t-test) ve většině zkoumaných koncentrací 5-FU. Pokud nebylo dosaženo statistického významu, byl zachován

trend k vyšší toxicitě 5-FU v kombinaci s kalciumfolinátem. Mediány hodnot absorbance byly 2. den průměrně o 19,8 % nižší u buněk s CF (17,5-24,3 %, hodnota pro koncentraci 5-FU 12,2 µg/mL vynechána, jedná se pravděpodobně o chybu měření a rozdíl činil pouze 4,4 %). 4. den byly mediány hodnot absorbance buněk s CF nižší o 29,8 % (10-47 %) s výraznějším rozdílem ve vyšších koncentracích 5-FU. 7. den byly buňky s 5-FU mrtvé ve všech koncentracích 5-FU (výsledky nejsou presentovány). Na základě těchto zjištění lze předpokládat, že v přítomnosti uridinu nabývá inhibice TS vlivem 5-FU na významu.

### **A** Day 2: 5-FU only and 5-FU + calciumfolinate



### **B** Day 4: 5-FU only and 5-FU + calciumfolinate

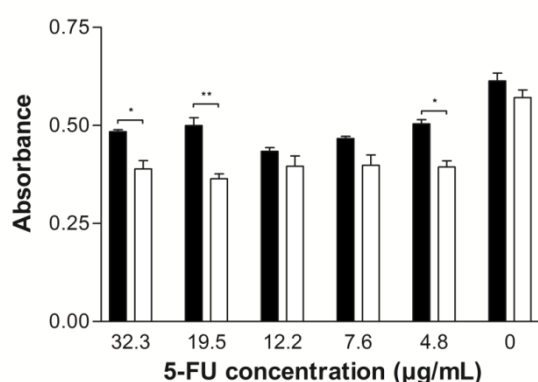


*Graf 21. MTT test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Buňky v přítomnosti různých koncentrací 5-FU. Černé sloupce znázorňují metabolickou aktivitu buněk bez kalciumfolinátu, bílé sloupce buňky s 20 µg/mL (42,2 µM) kalciumfolinátu (nepublikovaná data).*

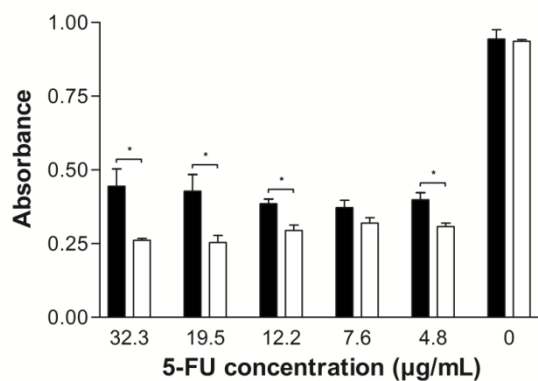
V případě, že v médiu buněk byl kromě 5-FU a uridinu přítomen také thymidin (graf 23), došlo k delšímu přežití buněk – buňky byly ve většině testovaných koncentrací 5-FU živé ještě 7. den (graf 23C), což je ve shodě s předchozími výsledky s kombinací thymidinu a uridinu (obr. 25, grafy 14, 15 a

17). Zcela se vytratil efekt kalciumfolinátu na toxicitu 5-FU, neboť inhibice TS ztrácí význam v nadbytku thymidinu a případná inkorporace 5-FU do DNA může být nadbytkem thymidinu antagonisována. Bylo tedy prokázáno, že keratinocyty buněčné linie HaCaT reagují na přítomnost látek modulujících účinek 5-FU podobně jako buňky lidského karcinomu tračníku SW948 ve studii Codacci-Pisanelliho et al (Codacci-Pisanelli et al. 2008).

**A** Day 2: Uridine protective effect against 5-FU toxicity is lowered by calciumfolinate addition

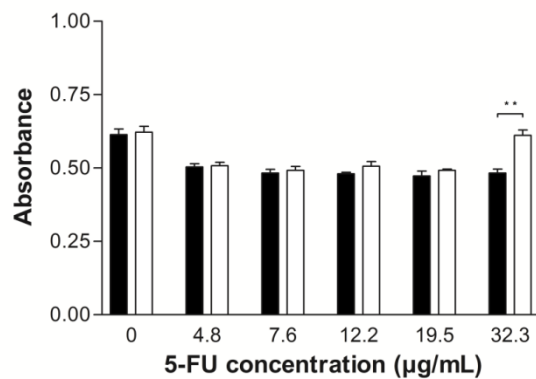


**B** Day 4: Uridine protective effect against 5-FU toxicity is lowered by calciumfolinate addition

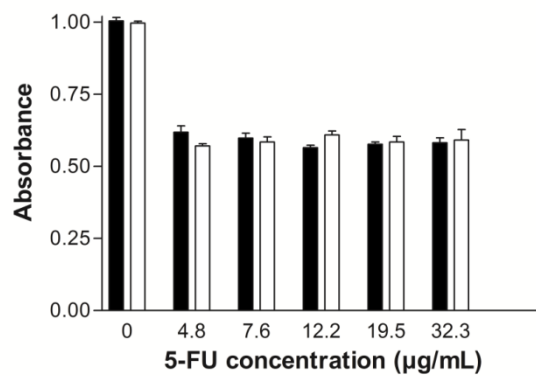


Graf 22. MTT test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Buňky v přítomnosti různých koncentrací 5-FU a 50 µg/mL (204,8 µM) uridinu. Černé sloupce znázorňují metabolickou aktivitu buněk bez kalciumfolinátu, bílé sloupce buňky s 20 µg/mL (42,2 µM) kalciumfolinátu (nepublikovaná data).

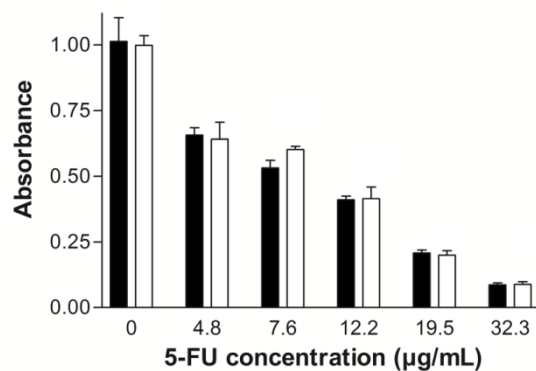
**A** Day 2: Uridine and thymidine protective effect is not lowered by calciumfolinate addition



**B** Day 4: Uridine and thymidine protective effect is not lowered by calciumfolinate addition

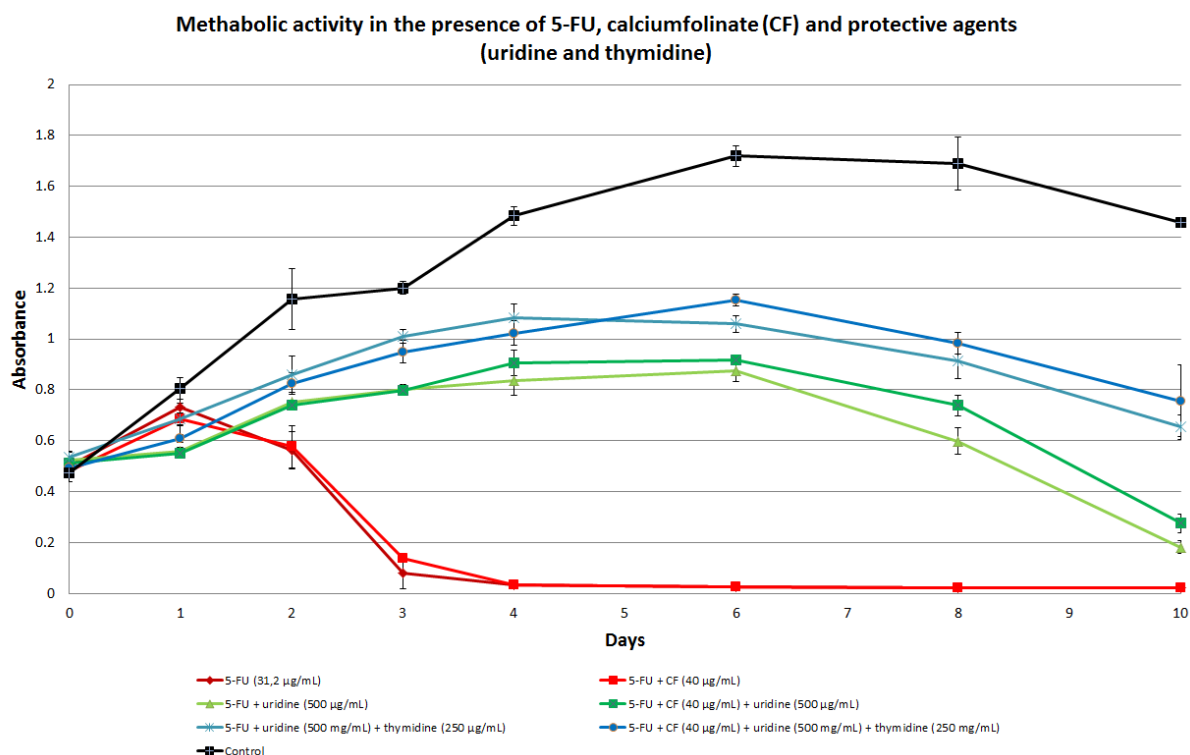


**C** Day 7: Uridine and thymidine protective effect is not lowered by calciumfolinate addition



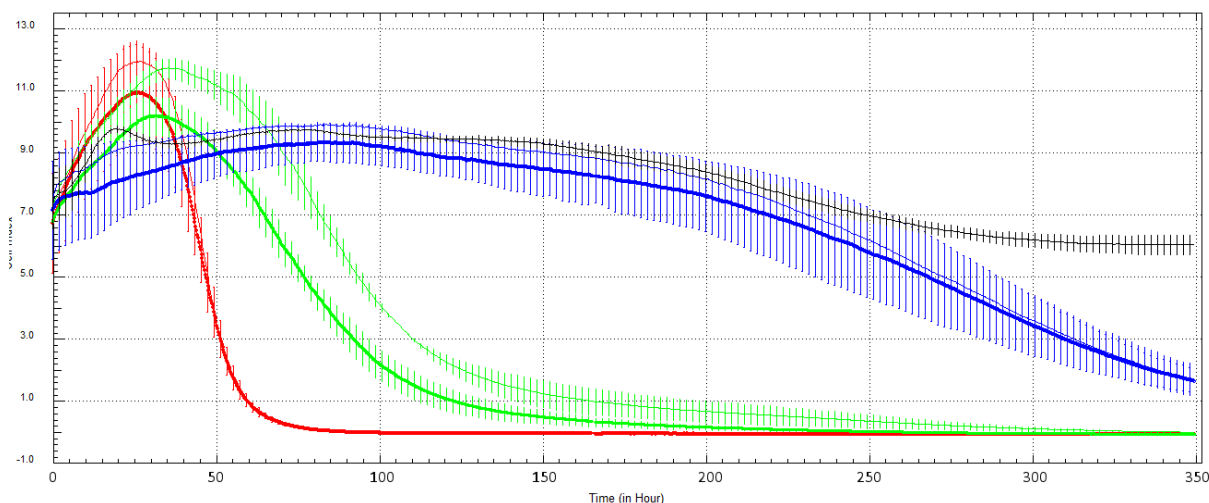
Graf 23. MTT test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Buňky v přítomnosti různých koncentrací 5-FU, 50 µg/mL (204,8 µM) uridinu a 25 µg/mL (103,2 µM) thymidinu. Černé sloupce znázorňují metabolickou aktivitu buněk bez kalciumfolinátu, bílé sloupce buňky s 20 µg/mL (42,2 µM) kalciumfolinátu (nepublikovaná data).

MTT test prokázal, že pokud byly v médiu buněk přítomny protektivní nukleosidy v 10x vyšší koncentraci (graf 24 – 500  $\mu\text{g/mL}$  (2,05 mM) uridinu, resp. 500  $\mu\text{g/mL}$  uridinu a 250  $\mu\text{g/mL}$  (1,03 mM) thymidinu) a koncentrace 31,2  $\mu\text{g/mL}$  (240  $\mu\text{M}$ ) 5-FU, vytratil se vliv kalciumfolinátu (40  $\mu\text{g/mL}$ , 84,4  $\mu\text{M}$ ) na toxicitu 5-FU, resp. zůstal patrný jenom velmi malý trend k vyšší toxicitě 5-FU v přítomnosti uridinu a CF (graf 24). Buňky byly 16. den již zcela mrtvé ve všech kombinacích 5-FU a protektivních látek (v grafu nezobrazeno). Zdá se, že při vyšší koncentraci 5-FU přestává být inhibice TS významným mechanismem účinku pro toxicitu 5-FU (je pouze mírný trend pro vyšší toxicitu 8. a 10. den). To je ve shodě s publikovanou studií, která potvrzuje, že ve vyšších koncentracích 5-FU kalciumfolinát na toxicitu 5-FU nemá vliv, protože vzhledem k saturaci molekul TS v buňkách není dalším zvýšením afinity FdUMP jejich inhibice zesilována (Codacci-Pisanelli et al. 2008).



Graf 24. MTT test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Toxicita 5-FU v koncentraci 31,2  $\mu\text{g/mL}$  (240  $\mu\text{M}$ ) v přítomnosti (světle červená) a bez přítomnosti (tmavě červená) 40  $\mu\text{g/mL}$  kalciumfolinátu (84,4  $\mu\text{M}$ ). Porovnání protektivního efektu uridinu (500  $\mu\text{g/mL}$ , 2,05 mM) v přítomnosti kalciumfolinátu (tmavě zelená) a bez kalciumfolinátu (světle zelená). Porovnání protektivního efektu uridinu (500  $\mu\text{g/mL}$ ) a thymidinu (250  $\mu\text{g/mL}$ , 1,03 mM) v přítomnosti kalciumfolinátu (tmavě modrá) a bez přítomnosti kalciumfolinátu (světle modrá) (nepublikovaná data).

V RTCA testu byl efekt CF v přítomnosti uridinu vyjádřen mírným snížením cell indexu. V přítomnosti 5-FU, uridinu a thymidinu efekt CF zaznamenaný nebyl (graf 25). Potvrzují se tak výsledky z MTT testů (grafy 21-23).



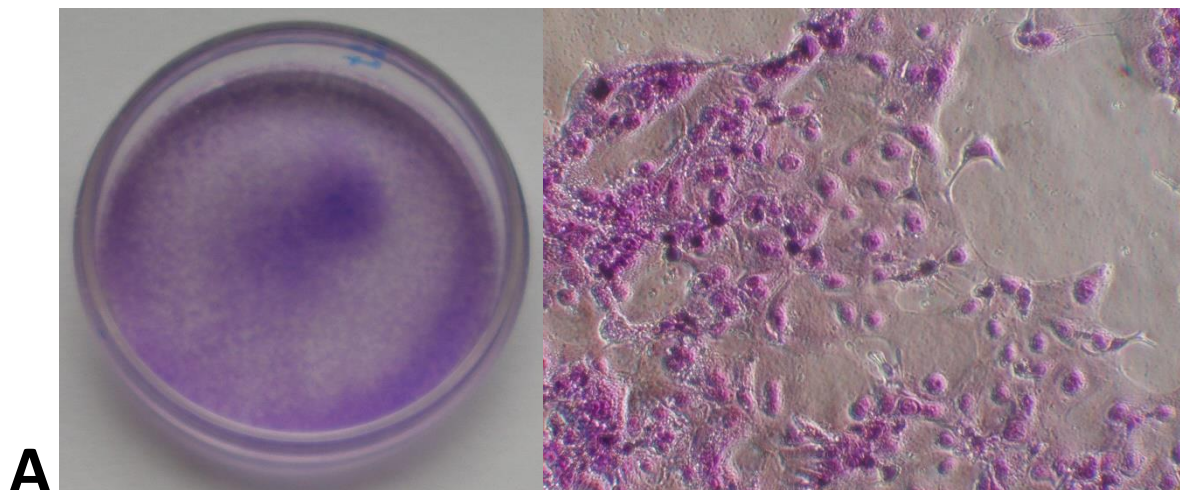
Graf 25. RTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Koncentrace 5-FU 7,5 µg/mL (57,7 µM), tučné křivky – jamky s 20 µg/mL (42,2 µM) CF, tenké křivky – jamky bez CF. ■ - pouze 5-FU ± CF, ■ - 5-FU a 50 µg/mL (204,8 µM) uridinu ± CF, ■ - 5-FU, 50 µg/mL (204,8 µM) uridinu a 25 µg/mL (103,2 µM) thymidinu ± CF, ■ - kontrola (bez protektivních agens, bez 5-FU a bez CF) (nepublikovaná data).

## 5.9. Další pyrimidinové nukleosidy (cytidin a deoxycytidin) a jejich kombinace

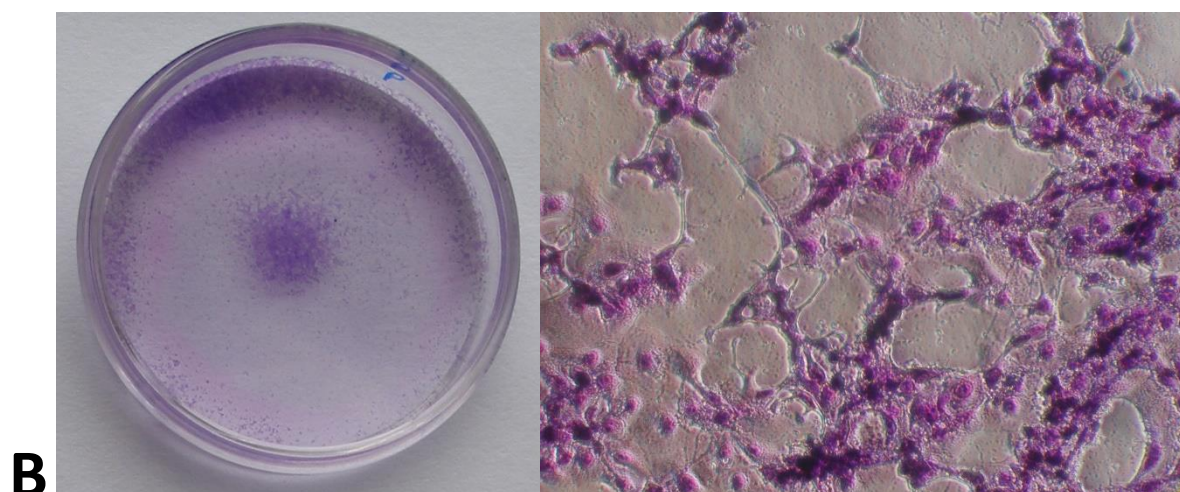
Zajímavým zjištěním bylo, že při aplikaci cytidinu v koncentraci 100 µg/mL (411,2 µM) na buňky v jejichž médiu bylo 7,5 µg/mL (57,7 µM) 5-FU (obr 26A) byl po pěti dnech zaznamenaný podobný protektivní účinek, jako při aplikaci uridinu ve stejné koncentraci (obr. 24B). Deoxycytidin v koncentraci 100 µg/mL (440,1 µM) neprokazoval žádný protektivní efekt (obr. 26B). Uridin spolu s cytidinem v koncentracích 50 µg/mL (204,8 µM a 205,6 µM, celková koncentrace nukleosidů je stejná, jako při testech s jednotlivými nukleosidy) vykazovaly stejný protektivní efekt jako uridin samotný v koncentraci 100 µg/mL (409,5 µM, obr. 24B), nebo cytidin samotný v koncentraci 100 µg/mL (411,2 µM, obr. 26A). Kombinace cytidinu s thymidinem v koncentracích po 50 µg/mL (205,6 µM a 206,4 µM, obr. 26D) prokazovala stejný účinek, jako kombinace uridinu s thymidinem



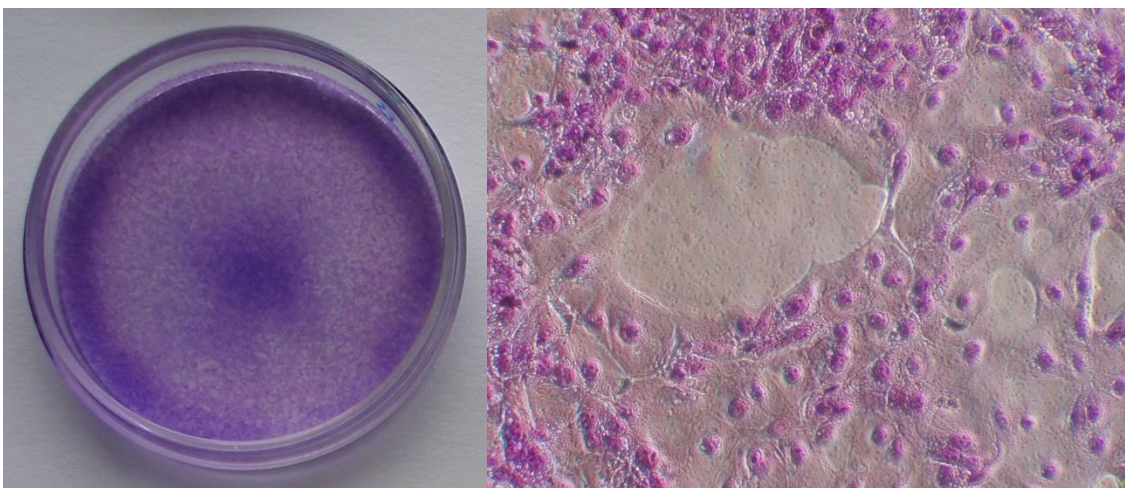
(obr. 25). Na základě těchto výsledků lze tedy konstatovat, že účinek cytidinu je podobný jako účinek uridinu.



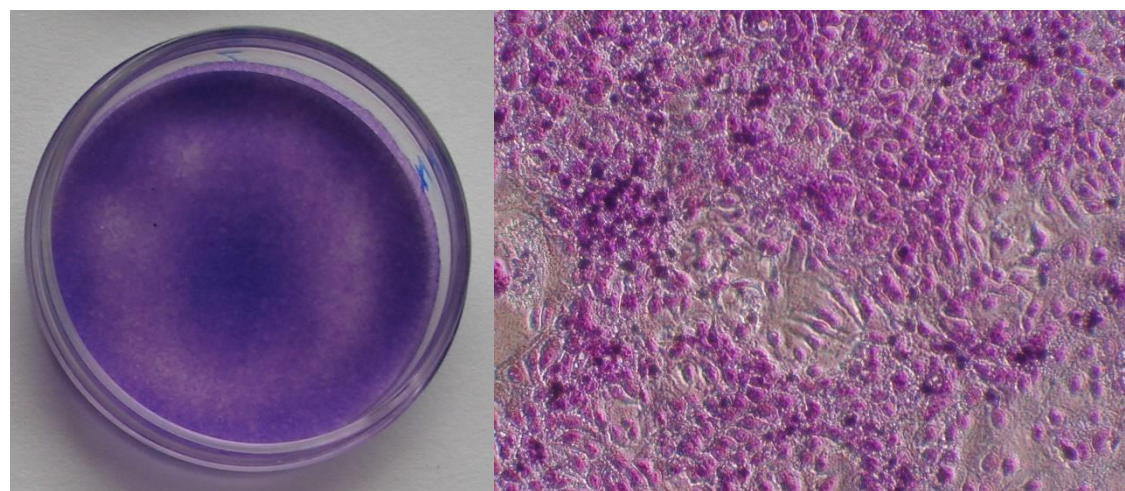
5-FU (7,5 µg/mL, 57,7 µM) + cytidin (100 µg/mL, 411,2 µM)



5-FU (7,5 µg/mL, 57,7 µM) + deoxycytidin (100 µg/mL, 440,1 µM)

**C**

5-FU (7,5  $\mu\text{g/mL}$ , 57,7  $\mu\text{M}$ ) + cytidin (50  $\mu\text{g/mL}$ , 205,6  $\mu\text{M}$ ) + uridin (50  $\mu\text{g/mL}$ , 204,8  $\mu\text{M}$ )

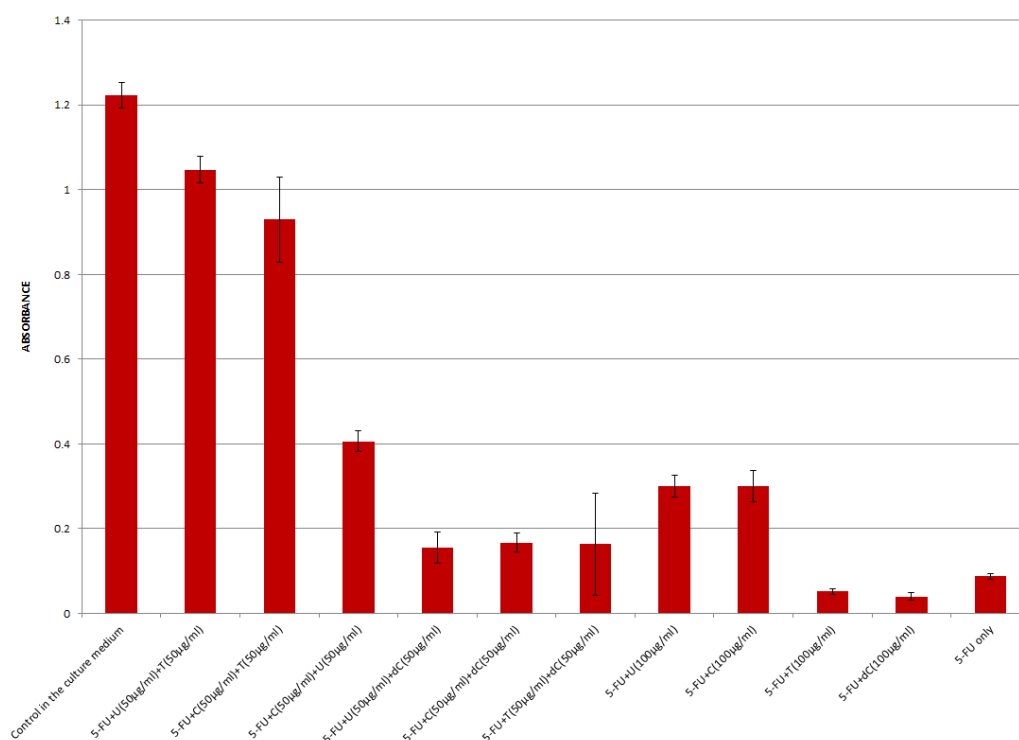
**D**

5-FU (7,5  $\mu\text{g/mL}$ , 57,7  $\mu\text{M}$ ) + cytidin (50  $\mu\text{g/mL}$ , 205,6  $\mu\text{M}$ ) + thymidin (50  $\mu\text{g/mL}$ , 206,4  $\mu\text{M}$ )

*Obrázek 26. Fotografie Petriho misek a mikrofotografie (100 x zvětšené). Porovnání nárůstu buněk kultivovaných 5 dní v koncentraci 7,5  $\mu\text{g/mL}$  5-FU (57,7  $\mu\text{M}$ ). A – 5-FU + cytidin (100  $\mu\text{g/mL}$ , 411,2  $\mu\text{M}$ ), B – deoxycytidin (100  $\mu\text{g/mL}$ , 410,2  $\mu\text{M}$ ), C – kombinace cytidinu (50  $\mu\text{g/mL}$ , 205,6  $\mu\text{M}$ ) a uridinu (50  $\mu\text{g/mL}$ , 204,8  $\mu\text{M}$ ), D – kombinace cytidinu (50  $\mu\text{g/mL}$ , 205,6  $\mu\text{M}$ ) a thymidinu (50  $\mu\text{g/mL}$ , 206,4  $\mu\text{M}$ ) (Hartinger et al. 2015).*

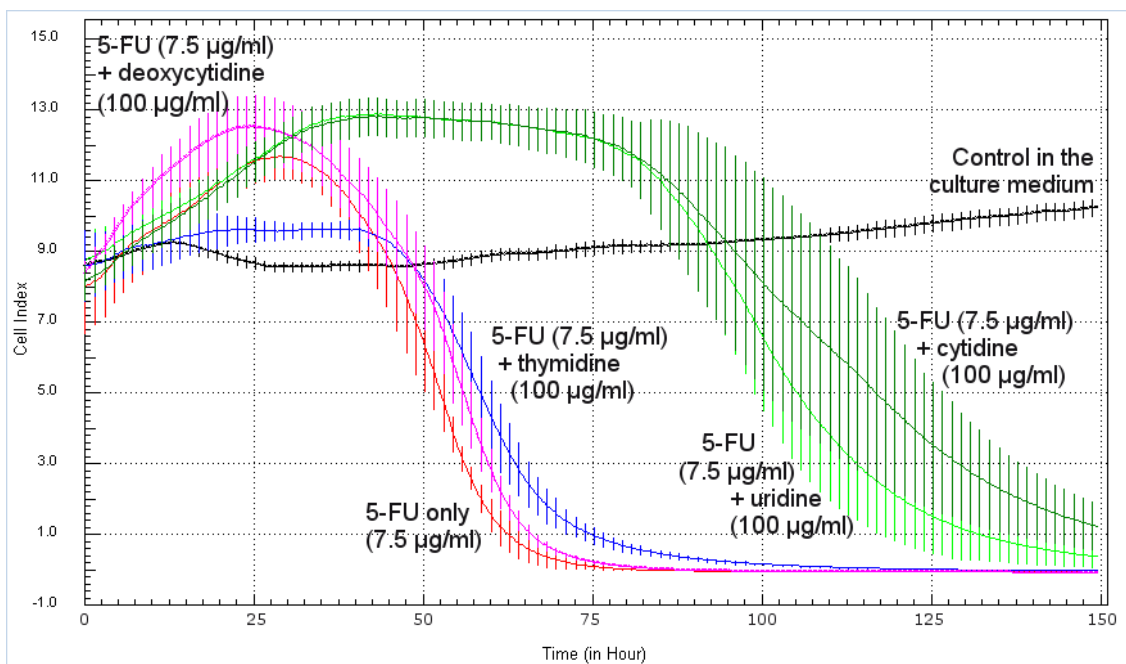
Výsledky z NTCA testu (obr. 24A-D, 25 a 26A-D) byly potvrzeny i MTT testem po čtyřech dnech působení protektivních agens. Z grafu 25 je patrné, že uridin v kombinaci s thymidinem vykazuje podobný účinek, jako cytidin v kombinaci s thymidinem. Tento účinek je synergický, nikoliv pouze aditivní. Aditivní účinek se projeví při kombinaci uridinu s cytidinem (téměř stejný účinek jako samotný uridin, nebo samotný cytidin).

Dále byly tyto výsledky potvrzeny RTCA testy (grafy 27-29). Cytidin stejně jako uridin prodlužoval přežití buněk o cca 50 hodin, oproti thymidinu, nebo deoxycytidinu (graf 26). Graf 28 znázorňuje protektivní účinek cytidinu, thymidinu a jejich kombinace. Pro názornost zde uvádíme graf 29, který je téměř totožný, avšak cytidin je nahrazen uridinem. Potvrzuje se tak zaměnitelnost cytidinu a uridinu. *In vitro* u buněčné linie lidských keratinocytů HaCaT je tedy synergická protektivní účinnost cytidinu s thymidinem vyjádřena stejně, jako v případě kombinace uridinu a thymidinu. Tento výsledek byl potvrzen třemi rozdílnými metodami analýzy buněčné viability.

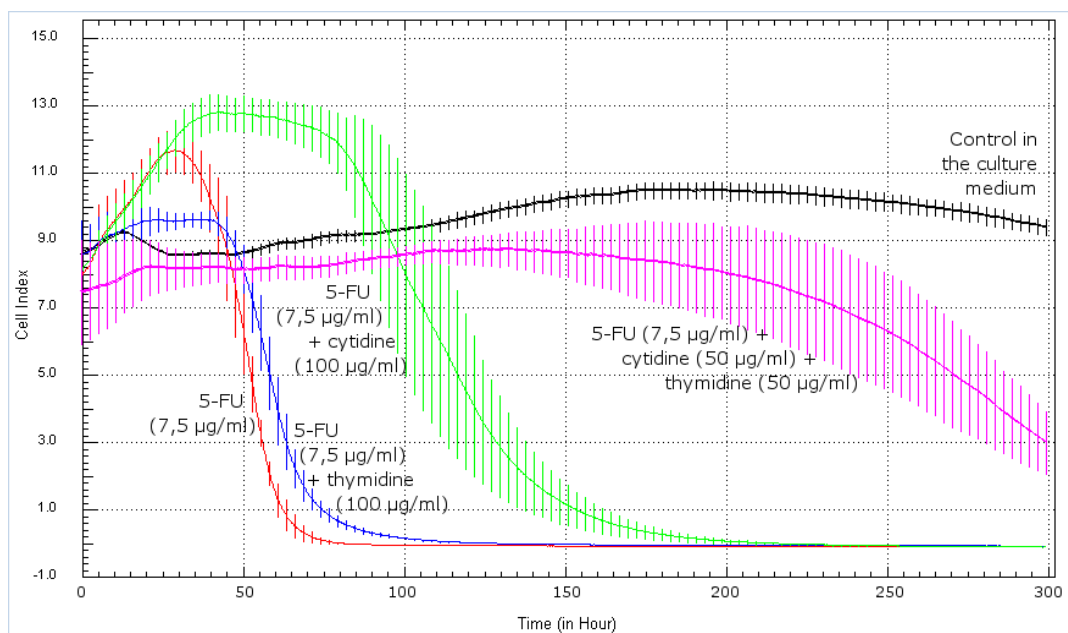


Graf 26. MTT test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Metabolická aktivita 4. den po působení 5-FU (7,5 µg/mL, 57,7 µM) v přítomnosti různých kombinací protektivních nukleosidů (Hartinger et al. 2015).

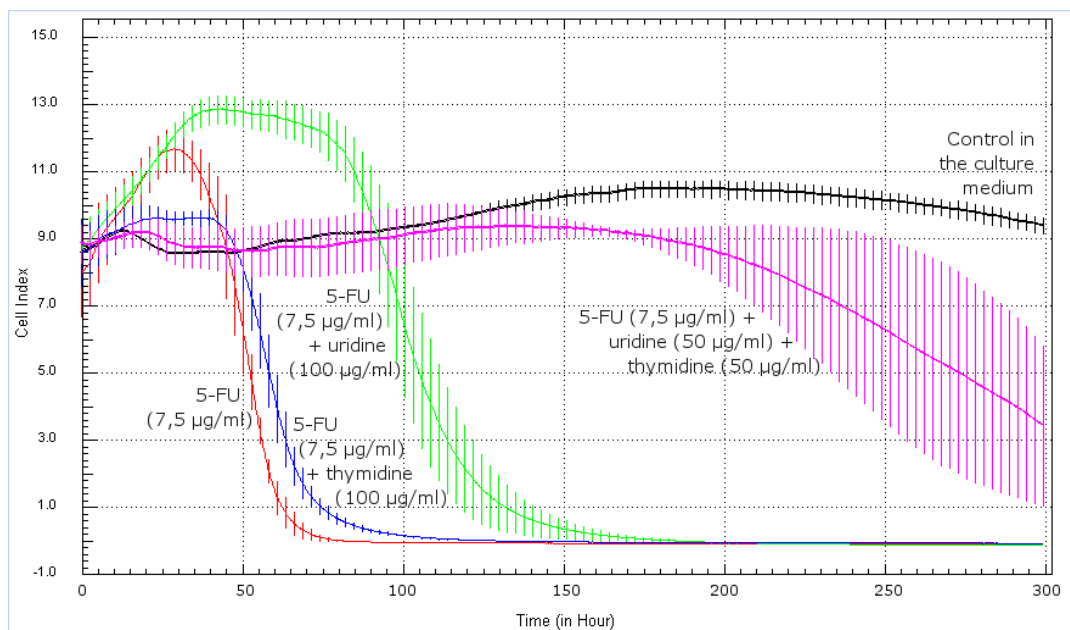




Graf 27. RTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Protektivní účinek pyrimidinových nukleosidů (v koncentracích 100 µg/mL) na toxicitu vyvolanou 7,5 µg/mL (57,7 µM) 5-FU (Hartinger et al. 2015).



Graf 28. RTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Protektivní účinek thymidinu (100 µg/mL, 412,9 µM), cytidinu (100 µg/mL, 411,2 µM) a jejich kombinace (každý v koncentraci 50 µg/mL, takže výsledná koncentrace nukleosidů je stejná) na buňky, v jejichž médiu je 7,5 µg/mL (57,7 µM) 5-FU (Hartinger et al. 2015).

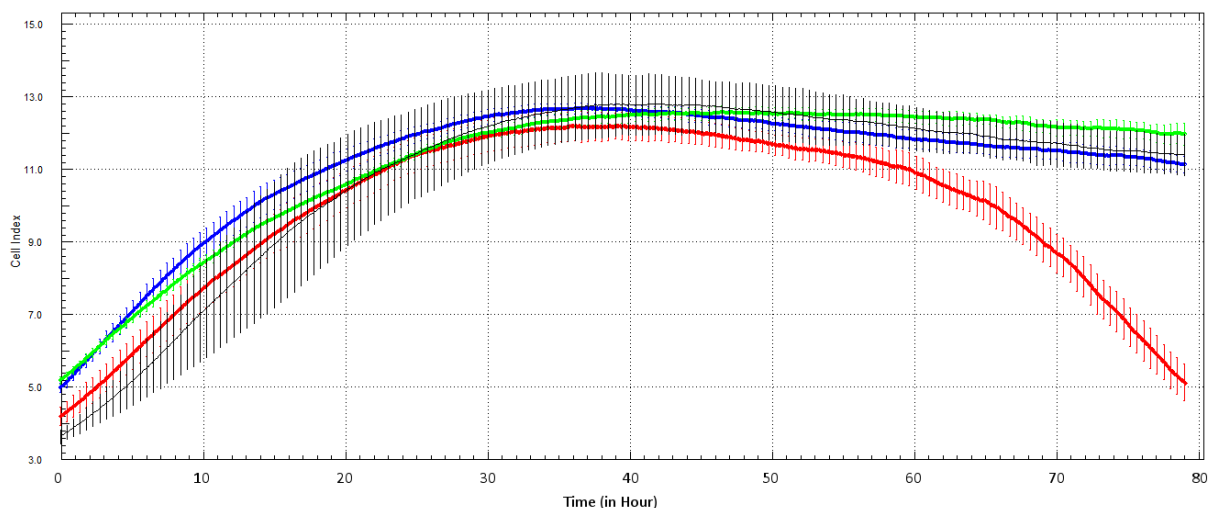


Graf 29. RTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Protektivní účinek thymidinu ( $100 \mu\text{g/mL}$ ,  $412,9 \mu\text{M}$ ), uridinu ( $100 \mu\text{g/mL}$ ,  $409,5 \mu\text{M}$ ) a jejich kombinace (každý v koncentraci  $50 \mu\text{g/mL}$ , takže výsledná koncentrace nukleosidů je stejná) na buňky, v jejichž médiu je  $7,5 \mu\text{g/mL}$  ( $57,7 \mu\text{M}$ ) 5-FU (Hartinger et al. 2015).

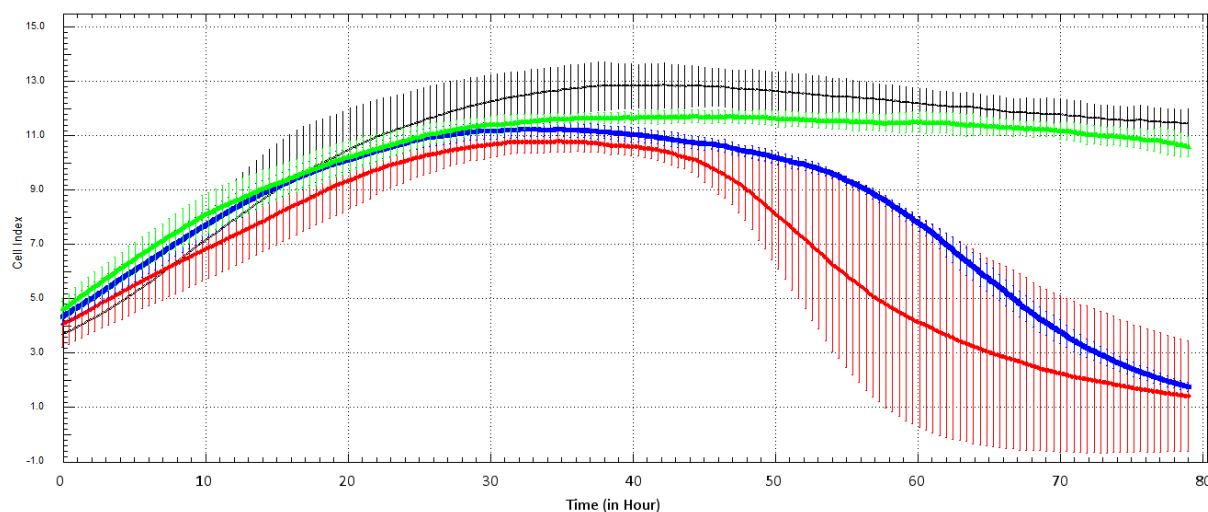
V RTCA pokusu bylo zároveň zjištěno, že kombinace  $50 \mu\text{g/mL}$  uridinu a thymidinu, resp. cytidinu a thymidinu, resp. uridinu a cytidinu bez přítomnosti 5-FU nevykazují po dobu 300 hodin působení toxický vliv na keratinocyty (výsledky nejsou presentovány).

## 5.10. Protektivní efekt uracilu

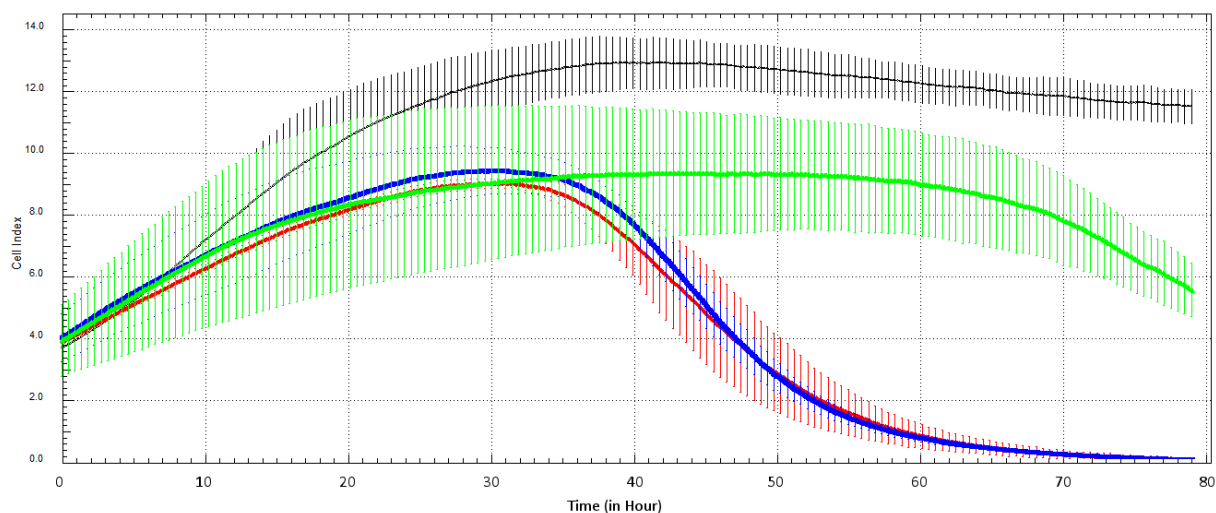
V RTCA testu byl porovnáván protektivní účinek uridinu a uracilu v různých koncentracích 5-FU (grafy 30-32).



Graf 30. RTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Protektivní účinek uridinu a uracilu na 5-FU v koncentraci 1,9  $\mu\text{g/mL}$  (14,6  $\mu\text{M}$ ). ■ - pouze 5-FU, ■ - 5-FU + uracil (50  $\mu\text{g/mL}$ , 446  $\mu\text{M}$ ), ■ - 5-FU + uridin (50  $\mu\text{g/mL}$ , 205  $\mu\text{M}$ ), ■ - kontrola (nepublikovaná data).



Graf 31. RTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Protektivní účinek uridinu a uracilu na 5-FU v koncentraci 5,6  $\mu\text{g/mL}$  (43  $\mu\text{M}$ ). ■ - pouze 5-FU, ■ - 5-FU + uracil (50  $\mu\text{g/mL}$ , 446  $\mu\text{M}$ ), ■ - 5-FU + uridin (50  $\mu\text{g/mL}$ , 205  $\mu\text{M}$ ), ■ - kontrola (nepublikovaná data).



Graf 32. RTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Protektivní účinek uridinu a uracilu na 5-FU v koncentraci 16,7  $\mu\text{g/mL}$  (128  $\mu\text{M}$ ) 5-FU. ■ - pouze 5-FU, ■ - 5-FU + uracil (50  $\mu\text{g/mL}$ , 446  $\mu\text{M}$ ), ■ - 5-FU + uridin (50  $\mu\text{g/mL}$ , 205  $\mu\text{M}$ ), ■ - kontrola (nepublikovaná data).

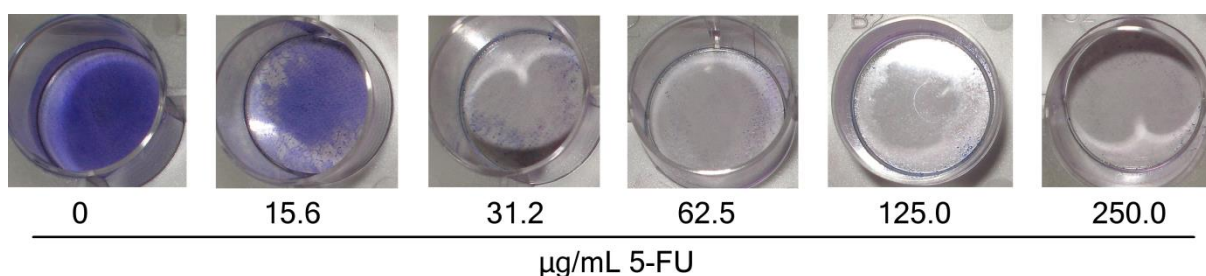
Křivky cell indexu buněk v koncentracích 1,9  $\mu\text{g/mL}$  (14,6  $\mu\text{M}$ ) a 5,6  $\mu\text{g/mL}$  (45,4  $\mu\text{M}$ ) 5-FU narostly do stejné výšky, jako u kontrolních buněk (hodnota cca 11). V případě koncentrace 5-FU 16,7  $\mu\text{g/mL}$  (128,5  $\mu\text{M}$ ) dosáhl cell index pouze 80 % hodnoty křivky kontroly (kontrolní křivky grafů 30-32). Následně začal cell index buněk, na které působil pouze 5-FU klesat čím dříve, čím vyšší koncentrace 5-FU byla.

Protektivní efekt uridinu se projevil ve všech koncentracích 5-FU. V koncentracích 1,9  $\mu\text{g/mL}$  (14,6  $\mu\text{M}$ ) a 5,6  $\mu\text{g/mL}$  (45,4  $\mu\text{M}$ ) 5-FU křivky buněk s uridinem kopírují křivku kontrolních buněk. V koncentraci 16,7  $\mu\text{g/mL}$  (128,5  $\mu\text{M}$ ) buňky nedosáhnou tak vysokého cell indexu, jako kontrola, nicméně přežívají bez poklesu cell indexu do 70 hodin, po kterých začíná pokles (grafy 30-32).

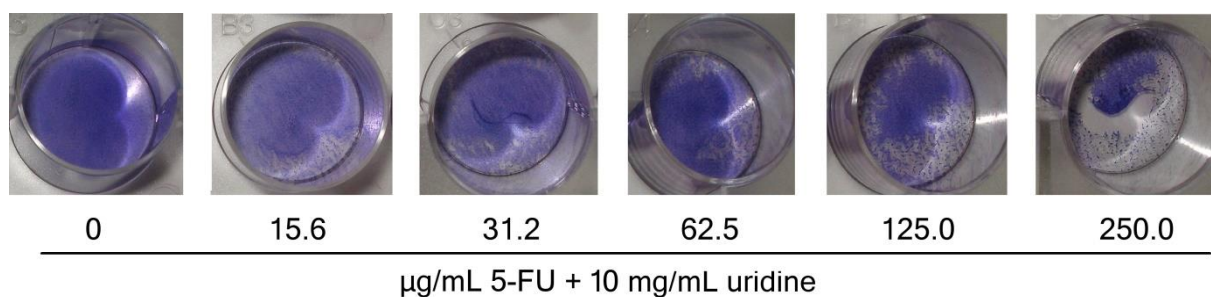
Uracil prokazuje protektivní účinek pouze v nižších koncentracích 5-FU (graf 30 a 31). Zatímco v koncentraci 1,9  $\mu\text{g/mL}$  (14,6  $\mu\text{M}$ ) 5-FU probíhá křivka cell indexu buněk s uracilem stejně, jako u kontrolních buněk a buněk s uridinem, v koncentraci 5,6  $\mu\text{g/mL}$  (45,4  $\mu\text{M}$ ) 5-FU začínají buňky odumírat po cca 55 hodinách, což je o něco déle, než v případě buněk, v jejichž médiu byl pouze 5-FU, ale výrazně méně, než u buněk, u kterých byl jako protektivní agens použit uridin. V koncentraci 16,7  $\mu\text{g/mL}$  (128,5  $\mu\text{M}$ ) průběh křivky cell indexu buněk s uracilem kopíruje průběh křivky buněk, v jejichž médiu byl pouze 5-FU. Účinek uracilu je tedy výrazně slabší, než protektivní účinek uridinu.

### 5.11. Toxicita 5-FU a protektivní efekt uridinu u primárních keratinocytů

Pro testy toxicity 5-FU a protektivního účinku uridinu se podařilo nakultivovat primární keratinocyty. Primární keratinocyty byly kultivovány 7 dní v přítomnosti různých koncentrací 5-FU (obr. 27). Stejně koncentrace 5-FU byly aplikovány také na buňky, v jejichž médiu bylo přítomno 10 mg/mL (40 mM) uridinu (obr. 28). Morfologie buněk v průběhu pokusu (2. a 5. den) je zachycena pomocí mikrofotografií ve fázovém kontrastu s následným digitálním zvýšením kontrastu pro lepší čitelnost (obr. 29 a 30). Na konci pokusu byly buňky zabarveny (obr. 27, 28 a 30).

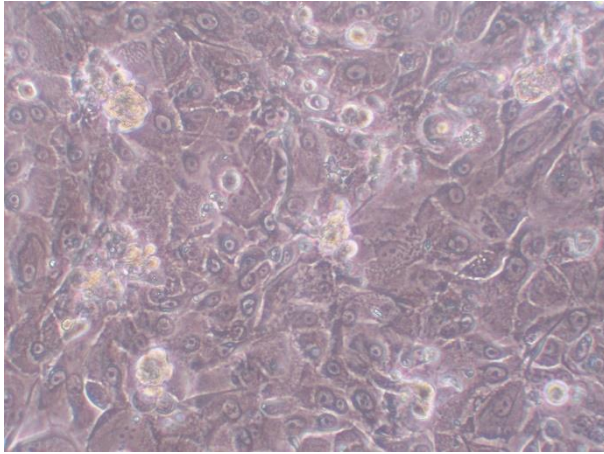


Obrázek 27. NTCA test, primární keratinocyty, které byly kultivovány 7 dní v přítomnosti různých koncentrací 5-FU (nepublikovaná data).

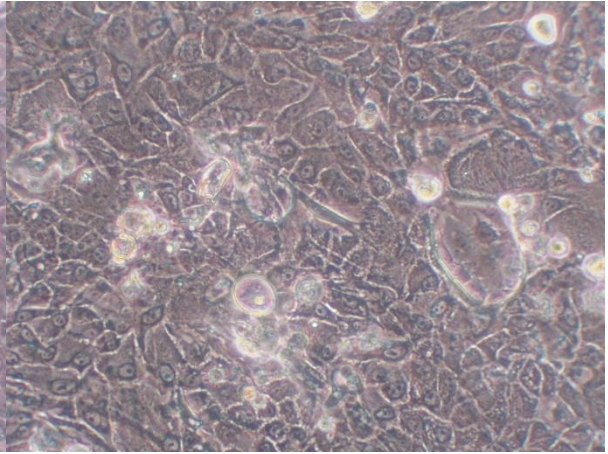


Obrázek 28. NTCA test, primární keratinocyty, které byly kultivovány 7 dní v přítomnosti různých koncentrací 5-FU a 10 mg/mL (41,3 mM) uridinu (nepublikovaná data).

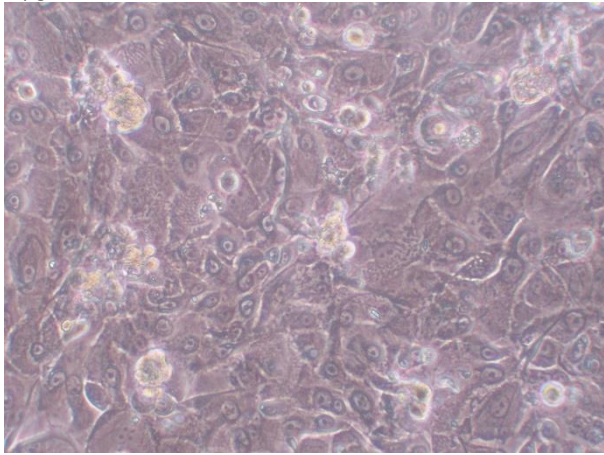




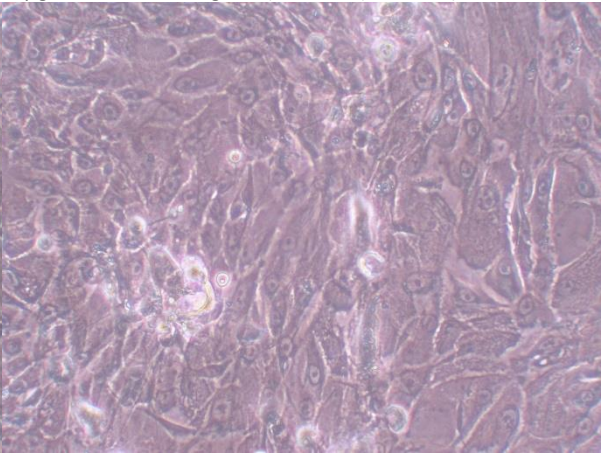
0 µg/mL 5-FU



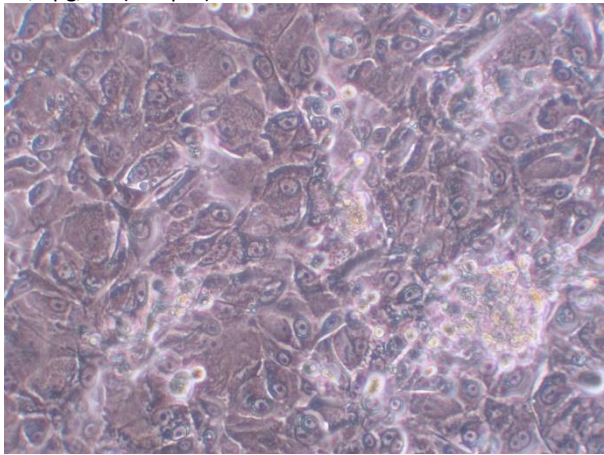
0 µg/mL 5-FU + 10 mg/mL (41,3 mM) uridinu (41,3 mM)



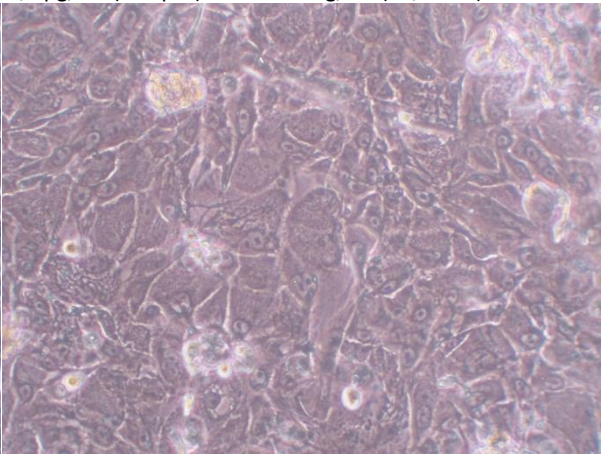
15,6 µg/mL (120 µM) 5-FU



15,6 µg/mL (120 µM) 5-FU + 10 mg/mL (41,3 mM) uridinu

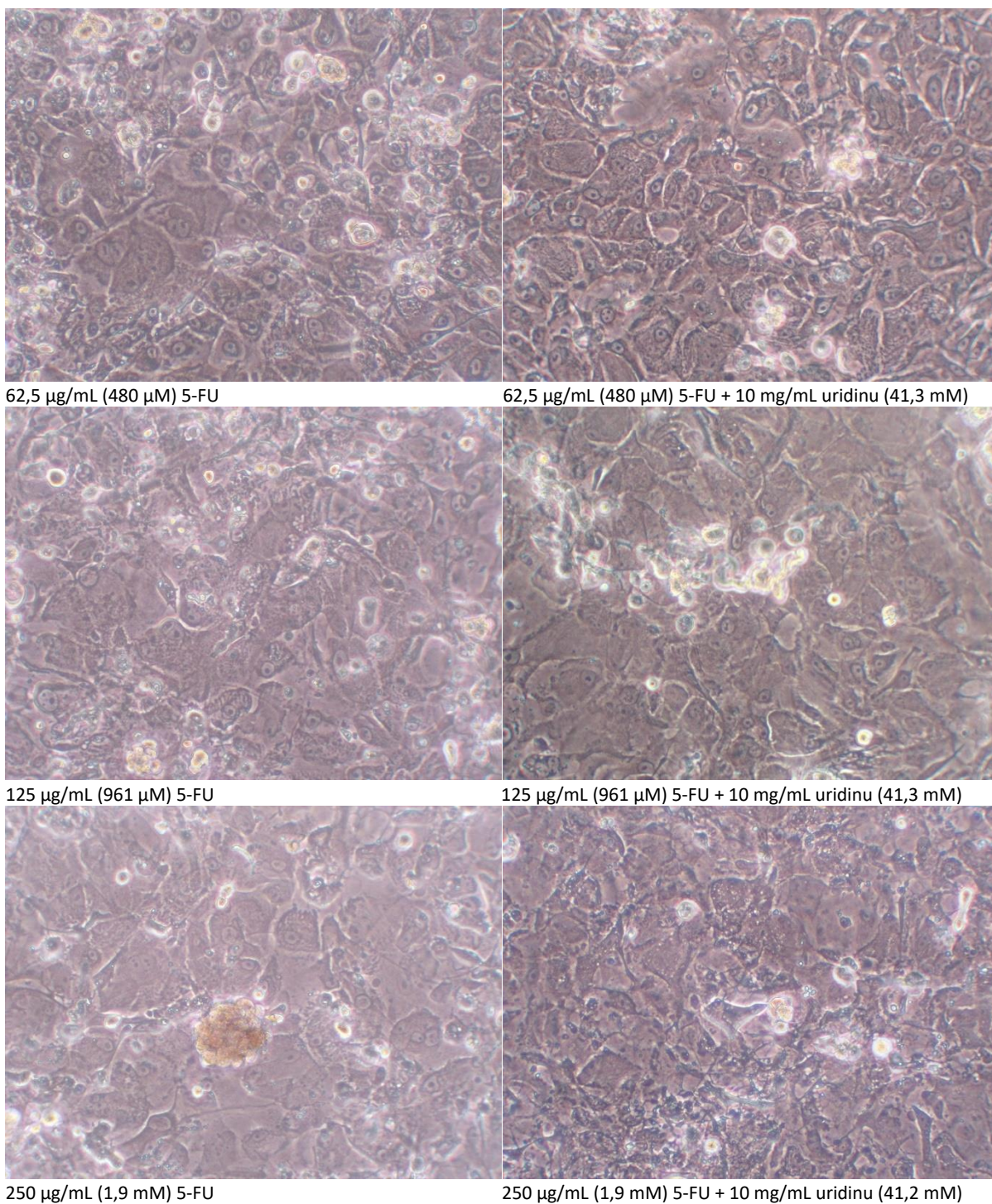


31,2 µg/mL (240 µM) 5-FU



31,2 µg/mL (240 µM) 5-FU + 10 mg/mL uridinu (41,3 mM)

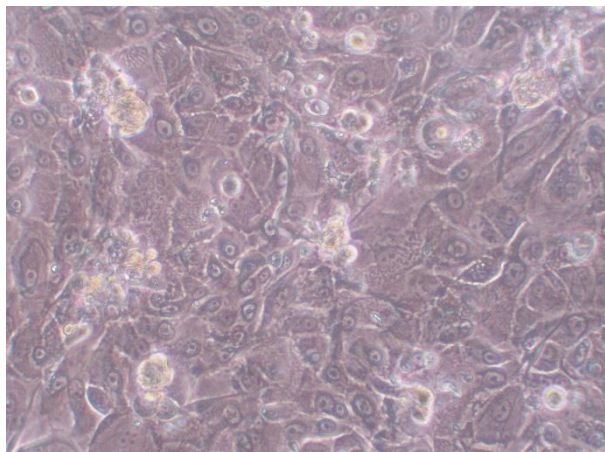




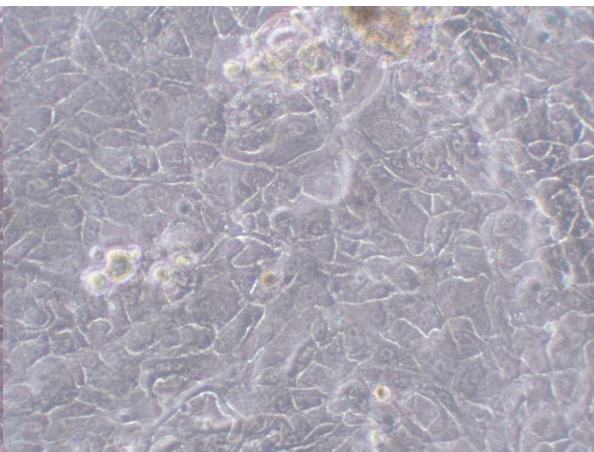
*Obrázek 29. Mikrofotografie (100x zvětšené) ve fázovém kontrastu, primární keratinocyty. Porovnání nárůstu buněk v přítomnosti různých koncentrací 5-FU. Na pravé straně jsou buňky, kterým bylo do média přidáno 10 mg/mL uridinu (41,2 mM). Odečet po 2 dnech kultivace.*



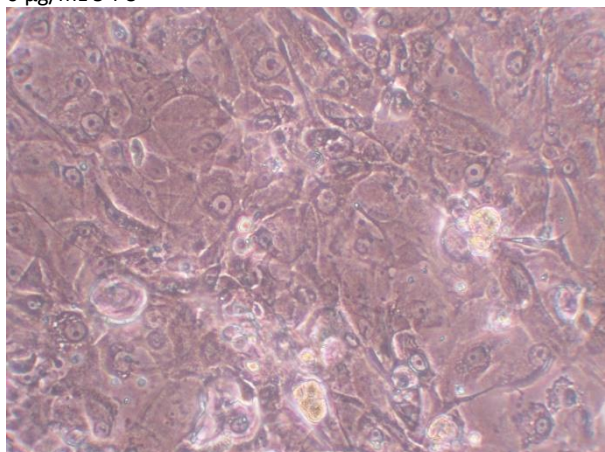
2. den nebyly na mikrofotografiích patrný rozdíly mezi buňkami ošetřenými pouze 5-FU a buňkami, které měly kromě 5-FU v mediu také uridin. Morfologie buněk je v obou případech velmi podobná a nejeví známky indukované apoptosy ani v nejvyšších koncentracích (až 250  $\mu\text{g/mL}$  (1,9 mM) 5-FU). Tento výsledek je shodný s výsledky s buněčnou linií HaCaT, kde bylo prokázáno, že 5-FU vyžaduje k rozvoji toxického účinku min. 2 dny.



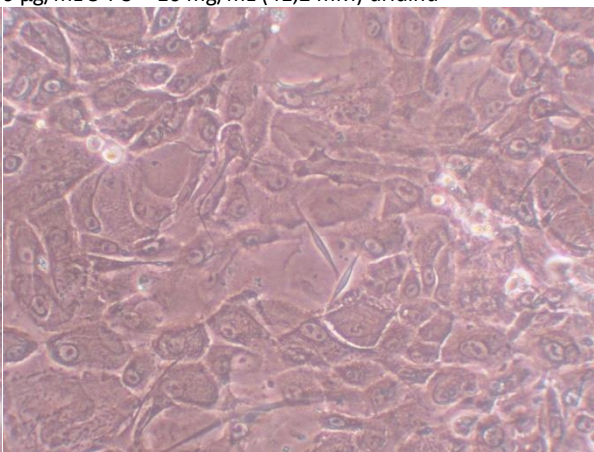
0  $\mu\text{g/mL}$  5-FU



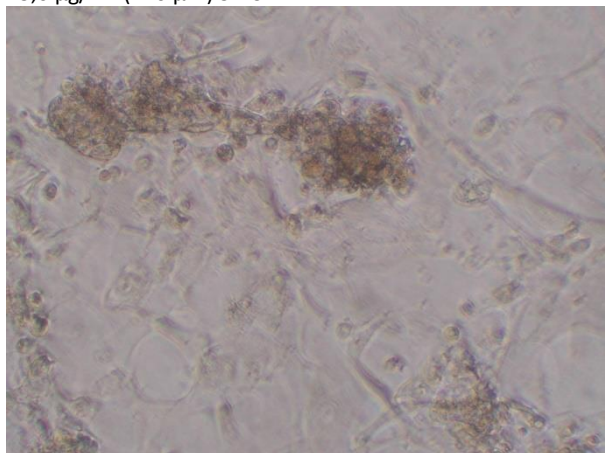
0  $\mu\text{g/mL}$  5-FU + 10 mg/mL (41,2 mM) uridinu



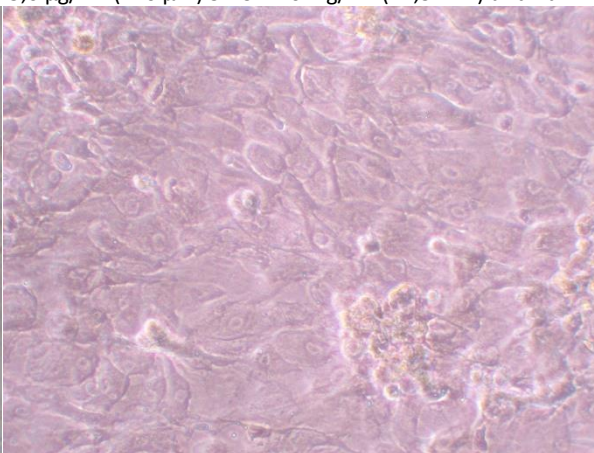
15,6  $\mu\text{g/mL}$  (120  $\mu\text{M}$ ) 5-FU



15,6  $\mu\text{g/mL}$  (120  $\mu\text{M}$ ) 5-FU + 10 mg/mL (41,3 mM) uridinu

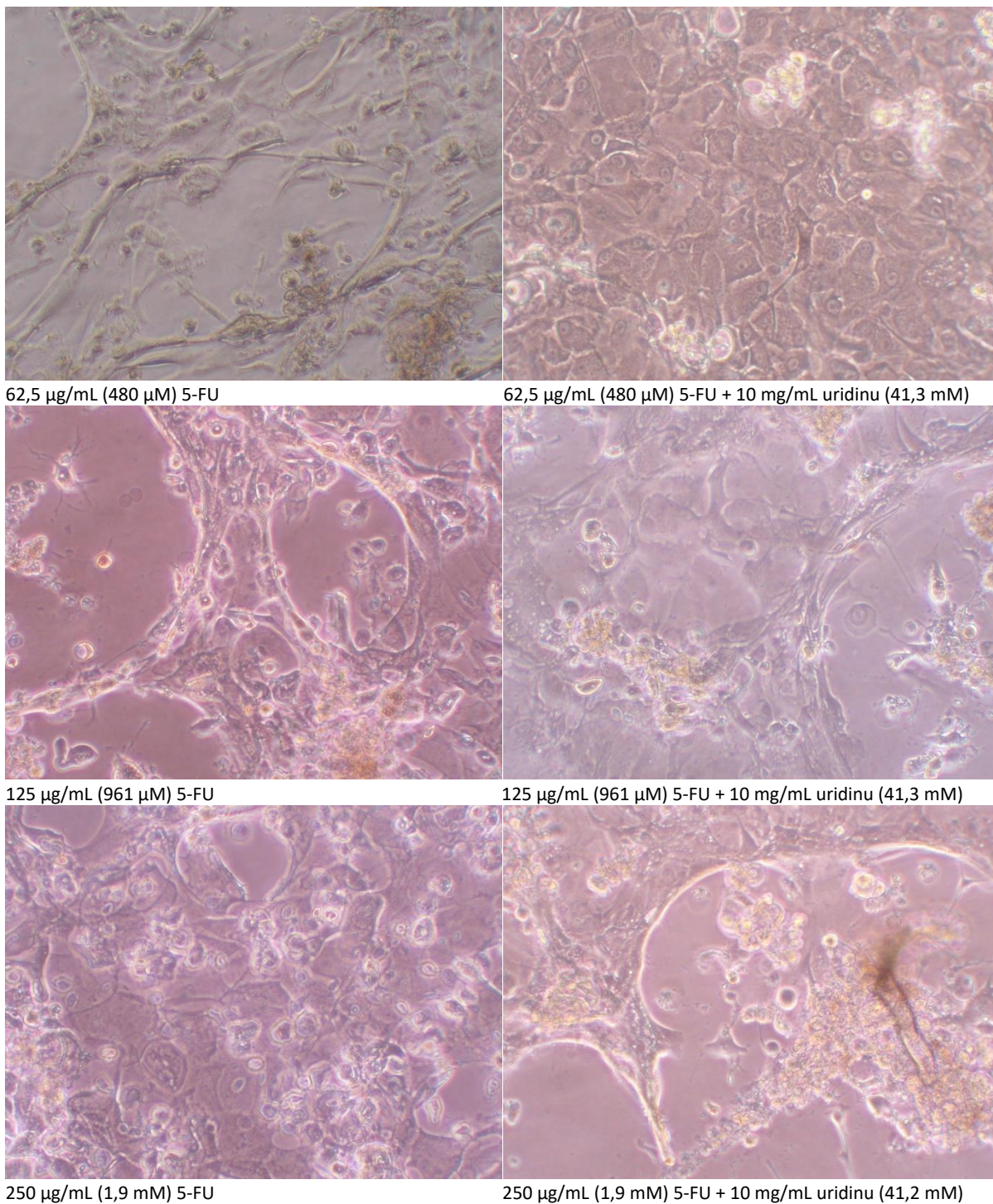


31,2  $\mu\text{g/mL}$  (240  $\mu\text{M}$ ) 5-FU



31,2  $\mu\text{g/mL}$  (240  $\mu\text{M}$ ) 5-FU + 10 mg/mL uridinu (41,3 mM)

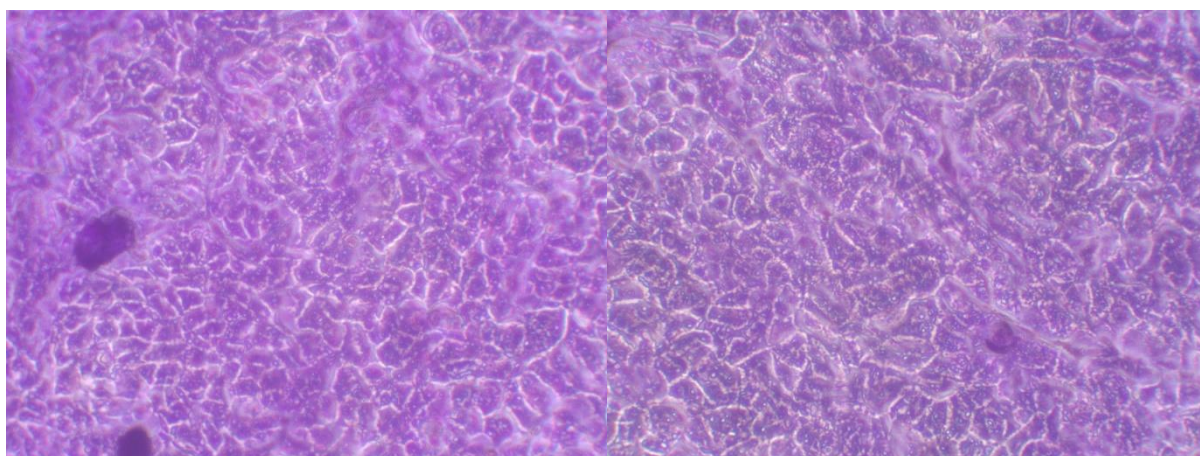




*Obrázek 30. Mikrofotografie (100x zvětšené) ve fázovém kontrastu, primární keratinocyty. Porovnání nárůstu buněk v přítomnosti různých koncentrací 5-FU. Na pravé straně jsou buňky, kterým bylo do média přidáno 10 mg/mL uridinu. Odečet po 5 dnech kultivace (nepublikovaná data).*

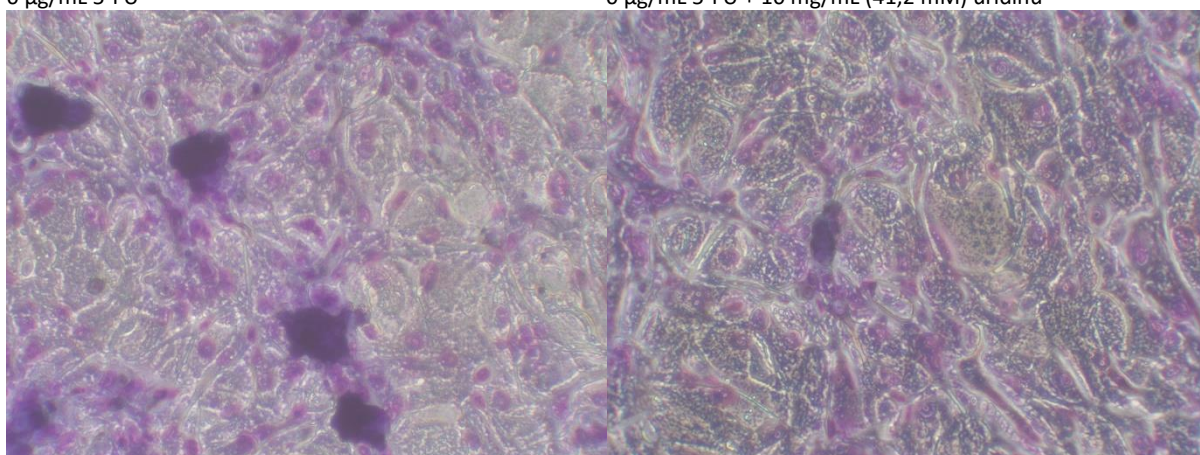


Toxický efekt na buňky kultivované 5 dní v přítomnosti 5-FU je patrný od koncentrace 31,25  $\mu\text{g/ml}$  (240  $\mu\text{M}$ ) 5-FU. Tato koncentrace je výrazně vyšší, než v případě HaCaT buněčné linie, kde již v koncentraci 7,5  $\mu\text{g/ml}$  (57,7  $\mu\text{M}$ ) došlo k úplnému odumření buněk 5. den (obr 24A). Na buňkách v jejichž médiu bylo zároveň 10 mg/mL (41,2 mM) uridinu se projevuje výrazná toxicita 5-FU až při koncentraci 125  $\mu\text{g/ml}$  (511,9  $\mu\text{M}$ ).



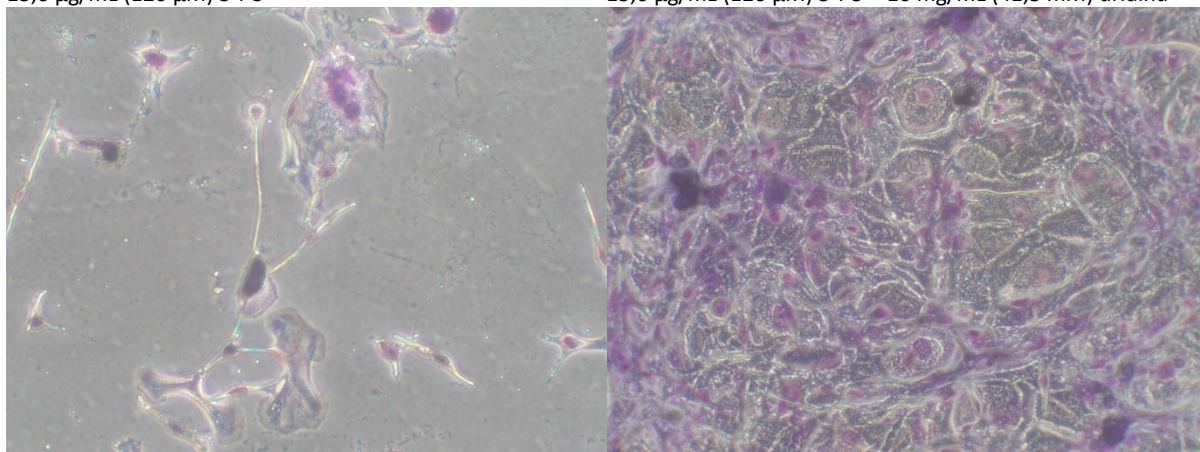
0  $\mu\text{g/ml}$  5-FU

0  $\mu\text{g/ml}$  5-FU + 10 mg/mL (41,2 mM) uridinu



15,6  $\mu\text{g/ml}$  (120  $\mu\text{M}$ ) 5-FU

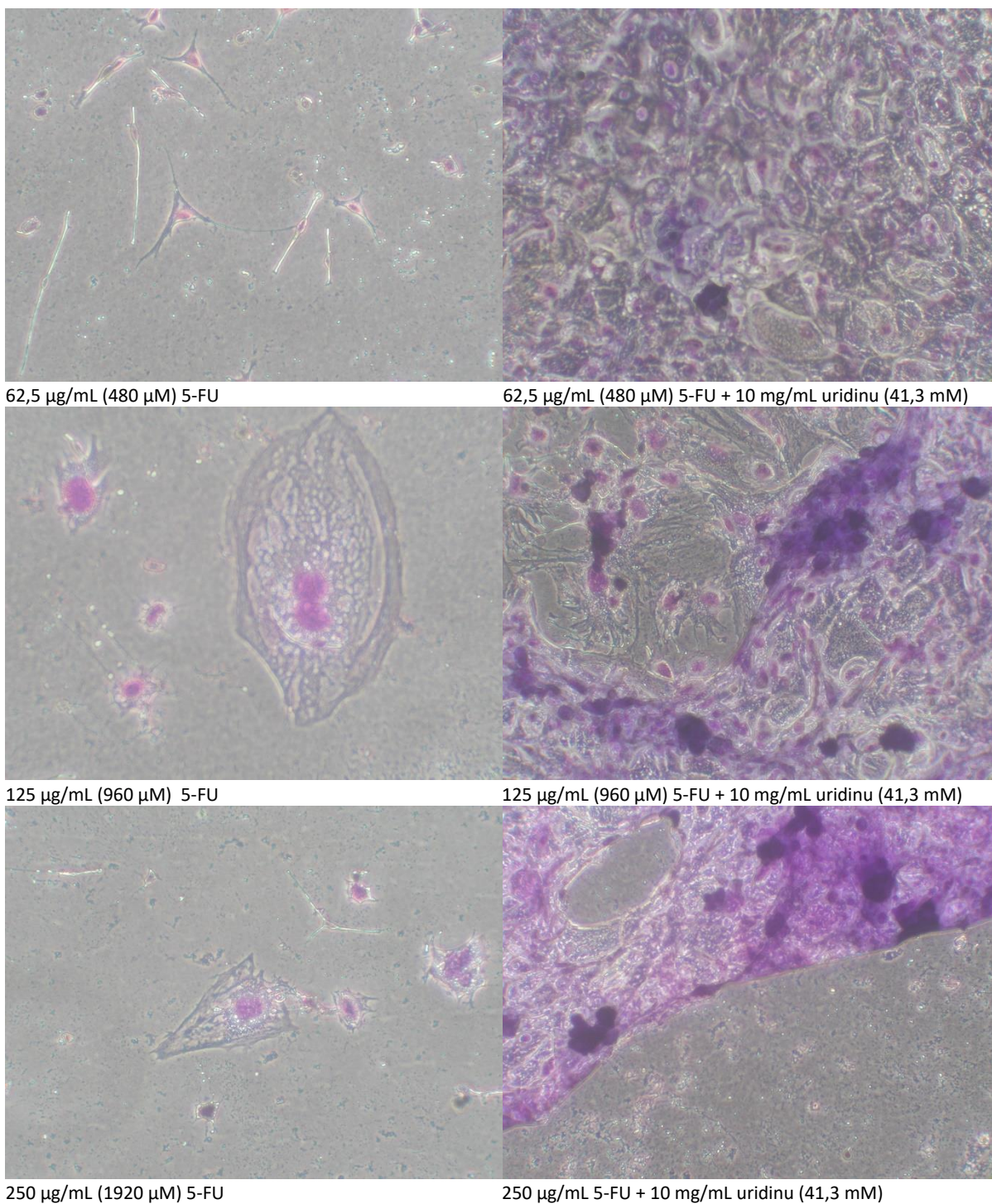
15,6  $\mu\text{g/ml}$  (120  $\mu\text{M}$ ) 5-FU + 10 mg/mL (41,3 mM) uridinu



31,2  $\mu\text{g/ml}$  (240  $\mu\text{M}$ ) 5-FU

31,2  $\mu\text{g/ml}$  (240  $\mu\text{M}$ ) 5-FU + 10 mg/mL uridinu (41,3 mM)



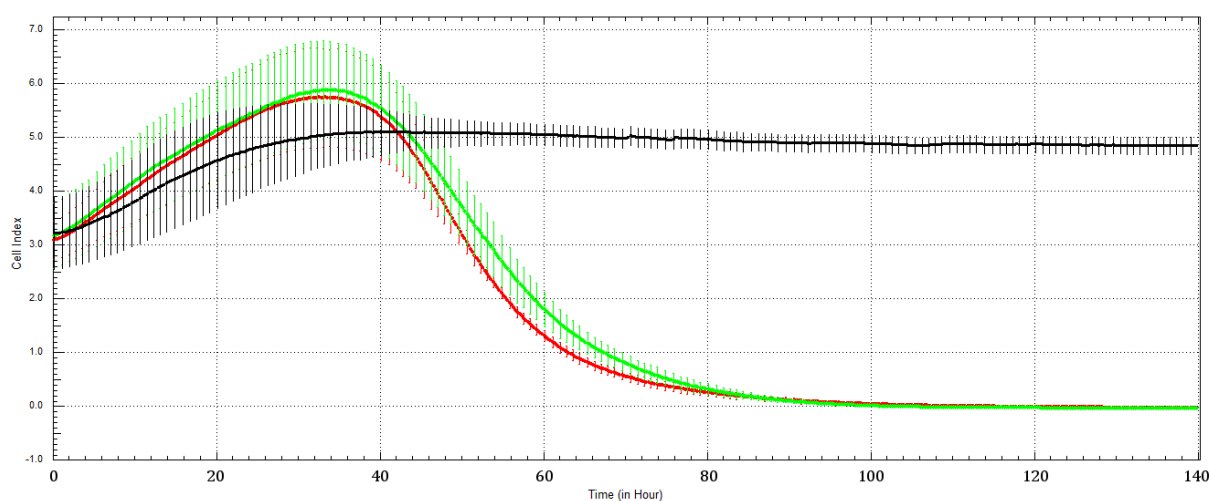


*Obrázek 31. Mikrofotografie (100x zvětšené), primární keratinocyty (zabarvené dle Giemsi-Romanowského). Porovnání nárůstu buněk v přítomnosti různých koncentrací 5-FU. Na pravé straně jsou buňky, kterým bylo do média přidáno 10 mg/mL uridinu. Odečet po 7 dnech kultivace (nepublikovaná data).*

Protektivní účinek uridinu je patrný již při koncentraci 31,2 µg/ml (240 µM) 5-FU. Přestože určitý cytotoxický efekt 5-FU se projevuje již od počáteční koncentrace 5-FU v obou částech pokusu, výrazně více buněk přežívá v přítomnosti uridinu, čemuž odpovídá i vzhled zabarvených plat (obr. 27 a 28).

## 5.12. Protektivní efekt pyridoxinu

Někteří autoři považují za modalitu léčby PPE perorální pyridoxin, nicméně klinické studie s pyridoxinem neprokázaly žádný efekt (Kang et al. 2010; Ota et al. 2014). Testovali jsme protektivní efekt pyridoxin hydrochloridu v koncentraci 520 µg/mL (2,5 mM) na HaCaT keratinocyty v přítomnosti 7,5 µg/mL 5-FU v RTCA testu (graf 33). Buňky s pyridoxinem věrně kopírují křivku kontrolních buněk, protektivní efekt nebyl zaznamenán.



Graf 33. RTCA test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Protektivní účinek pyridoxinu na 5-FU v koncentraci 7,5 µg/mL (57,7 µM). ■ - pouze 5-FU, ■ - 5-FU + pyridoxin HCl (520 µg/mL, 2,5 µM), ■ - kontrola (nepublikovaná data).

## 6. Diskuse

PPE je problematickým nežádoucím účinkem doprovázejícím terapii kapecitabinem a kontinuální infusí 5-FU (Biganzoli et al. 2002; Leonard et al. 2011; Lokich et al. 1989; Wolpin and Mayer 2008; Yun et al. 2010). V terapii tohot nežádoucího účinku bylo zkoušeno mnoho léčebných modalit, nicméně žádná není dostatečně efektivní. Při hledání vhodného antidota pro terapii fluoropyrimidiny vyvolané PPE, které by bylo možno aplikovat lokálně ve formě masti, jsme vycházeli z předpokladu, že PPE je vyvolávána toxickým působením 5-FU v oblasti dlaní a plosek nohou (Janusch et al. 2006). Zaměřili jsme se tedy především na zkoumání pyrimidinových nukleosidů, které mohou antagonisovat hlavní mechanismy účinku 5-FU (Codacci-Pisanelli et al. 2008). Pro zpřesnění představy o mechanismu účinku 5-FU byl rovněž zkoumán vliv CF, který zvyšuje toxicitu pouze v případě, že klíčovým mechanismem působení 5-FU je inhibice TS (Longley et al. 2003). Vzhledem k tomu, že v případě PPE dochází k poškození keratincytů, zvolili jsme jako modelovou buněčnou linii lidské keratinocyty HaCaT (Boukamp et al. 1988).

Při bolusovém podání se 5-FU vyznačuje nelineární farmakokinetikou s relativně krátkým poločasem ( $< 1$  hodina). Při zvyšování dávek se snižuje clearance, dochází k rapidnímu nárůstu plasmatických hladin a vyšší expozici. Pokud je bolusem podáno  $370 \text{ mg/m}^2$  5-FU, je dosaženo vrcholové hladiny kolem  $50 \text{ }\mu\text{g/mL}$  s následným velice rychlým poklesem hladin (Bocci et al. 2000). Při kontinuálním infusním podávání, které v rámci režimů používaných v terapii kolorektálního karcinomu následuje po iniciačním bolusu, je dosahováno hladin výrazně nižších (kolem  $1 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ) (Blaschke et al. 2012). Při podávání kapecitabinu je expozice 5-FU po jedné dávce  $1250 \text{ mg/m}^2$  velice malá ( $\text{AUC} = 0,461\text{--}0,698 \text{ mg} \times \text{h/L}$ ) s vrcholovými koncentracemi pouze  $0,22\text{--}0,31 \text{ }\mu\text{g/mL}$ . Poločas kapecitabinu i 5-FU je kratší, než 1 hodina a při opakovaném perorálním podávání s intervalem po dvanácti hodinách nelze tedy očekávat kumulaci a významný nárůst plasmatických hladin (Reigner et al. 2001). Ve většině našich pokusů jsme spolehlivě prokázali protektivní efekt uridinu, případně cytidinu, nebo jejich kombinací s thymidinem na toxicitu 5-FU v koncentracích několikanásobně vyšších, než je koncentrace dosažitelná v plasmě při podávání kontinuální infuse, nebo při opakovaném podávání kapecitabinu. Otázkou však zůstává, zda nedochází v pokožce dlaní a rukou ke kumulaci 5-FU. V literatuře není popsán rozsah distribuce 5-FU do kůže po systémovém podání a je možné, že u pacientů s PPE je koncentrace 5-FU v pokožce vyšší, než u ostatních pacientů např. vlivem extravasace z kapilár porušených vyšším tlakem (Martschick et al. 2009).

Při studiu viability buněk jsme zvolili 3 různé metody testování, které se navzájem doplňují a poskytují celistvý obraz o rozvoji toxicity 5-FU:

- Studium morfologie na mikrofotografiích (NTCA test).
- Studium metabolické aktivity pomocí MTT testu. Ve většině pokusů jsme měřili metabolickou aktivitu opakovaně, abychom zjistili její vývoj v čase. Jedná se o nejpřímější důkaz viability buněk z uvedených metod.
- RTCA test, který poskytuje velice podrobné informace o změnách chování buněk v čase. Interpretace výsledků z tohoto testu je však v některých případech obtížná (např. nárůst cell indexu v přítomnosti 5-FU, který jistě neznamena vyšší viabilitu buněk, ale pravděpodobně zachycuje spíše jejich stresovou reakci na 5-FU).

## 6.1.Toxicita 5-FU

Podle literárních údajů poškozuje 5-FU buňky některých buněčných linií již ve velmi nízkých koncentracích (1-5  $\mu\text{M}$ ) a po relativně krátké době (Codacci-Pisanelli et al. 2008). V našich pokusech jsme u HaCaT keratinocytů zaznamenali významnou toxicitu již po 48 hodinách působení 0,6  $\mu\text{g/mL}$  (5  $\mu\text{M}$ ) 5-FU. Toxicita po dvoudenním působení 5-FU nebyla sice na morfologii buněk zřetelná, nicméně pokud byly buňky kultivovány další 3 dny v čistém médiu, byly projevy toxicity zcela jednoznačné (obr. 12 a 13). Stejný vývoj jsme zaznamenali v MTT testu, pomocí kterého jsme zjistili při prvním odečtu po dvou dnech kultivace v koncentracích od 4,8-31,2  $\mu\text{g/mL}$  (37  $\mu\text{M}$ -127  $\mu\text{M}$ ) metabolickou aktivitu stejnou, jako u kontrolních buněk bez 5-FU a teprve po této době následoval pokles metabolické aktivity ve všech testovaných koncentracích 5-FU s větším efektem u vyšších koncentrací 5-FU. Sedmý den byly všechny buňky, kromě buněk kontrolních mrtvé (graf 2). V RTCA testu byl zaznamenán pokles cell indexu tím dříve, čím vyšší koncentraci 5-FU byly buňky vystaveny (graf 3). K poklesu po cca 2 dnech docházelo v koncentracích 5,6-7,5  $\mu\text{g/mL}$  (43  $\mu\text{M}$ -58  $\mu\text{M}$ ) což bylo opakovaně ověřeno v několika pokusech (jako pozitivní kontroly - grafy 3, 10, 13, 15, 16, 25, 27-29). *Letální účinek 5-FU na HaCaT keratinocyty je tedy zjistitelný již ve velice malých koncentracích od 0,6 mg/mL (5  $\mu\text{M}$ ), které opovídají dosažitelným plasmatickým koncentracím při aplikaci 5-FU v kontinuální infuzi (Blaschke et al. 2012). K nevratným změnám dochází již při 48 hodinové expozici.* V této době však ve většině testů ještě nejsou změny měřitelné, což dokazuje ve většině publikovaných studií opomíjený význam měření viability v čase. Vzhledem k tomu, že PPE se vyvíjí právě při dlouhodobé expozici nízkým koncentracím 5-FU považujeme měření viability v čase za adekvátní model pro testování potenciálních antidot.

Při RTCA testech, při kterých hraje významnou roli především adherence buněk ke dnu jamek, ale i případné povrchové změny na plasmatické membráně docházelo opakovaně i v malých koncentracích 5-FU (0,2 µg/mL, 1,5 µM) k navýšení hodnot cell indexu oproti kontrolním buňkám po cca 30 hodinách od přidání 5-FU (graf 3, 10, 11, 13-16, 24, 26-28). Při přidání thymidinu dochází k eliminaci tohoto efektu (grafy 13-16, 25, 27-29). Zdá se, že citlivou metodou RTCA testu byl zaznamenán projev stresu způsobeného 5-FU, který nebyl měřitelný pomocí jiných metod. Zároveň tento výsledek varuje před možnou chybnou interpretací, neboť metabolická aktivita buněk v přítomnosti 5-FU pouze klesala (graf 2). K tomuto nárůstu nebyl objeven korelát ani v morfologickém obrazu na mikrofotografiích a nelze tedy v žádném případě usuzovat na zvýšenou proliferaci, či viabilitu buněk v přítomnosti 5-FU. Naopak buňky i ve velmi nízkých koncentracích 5-FU přestávaly metabolisovat a proliferovat a odumíraly, o čem svědčí výsledky jak NTCA testu (mikrofotografie buněk v koncentraci 0,6 µg/mL (5 µM) 5-FU na obr. 12 a 13), tak MTT testu (koncentrace 4,8 µg/mL (37 µM), graf 2).

## 6.2.Uridin

Jako potenciální protektivní látku při terapii 5-FU jsme testovali uridin, který byl zkoumán i v klinické praxi jak při topickém podání v terapii PPE, tak i při systémovém podání „uridinové rescue“ (Juergen 2004; Kelsen et al. 1997; Netikova et al. 2009; Schwartz et al. 1996; van Groeningen et al. 1986; van Groeningen et al. 1989). Efekt uridinu na toxicitu 5-FU byl detailně byl popsán rovněž *in vitro* (Codacci-Pisanelli et al. 2008) a na zvířecích modelech (Codacci-Pisanelli et al. 1997; Hartmann and Bollag 1986; Martin et al. 1982; Nord et al. 1992), nicméně nikoliv na lidských keratinocytech. Toxická koncentrace uridinu, jako endogenní substance, je přirozeně o několik řádů vyšší, než toxicita 5-FU. Toxické projevy byly zaznamenatelné na mikrofotografiích po 3 dnech kultivace až při koncentraci 35 mg/mL (143,3 mM, obr. 14). MTT testem nebyla toxicita zaznamenána ani po třinácti dnech (312 hodin) působení koncentrace 750 µg/mL (3,07 mM, graf 4). V případě RTCA testu byl zaznamenán pokles cell indexu oproti kontrolním buňkám po cca 300 hodinách v koncentraci 500 µg/mL (2,05 mM, grafy 5 a 6). Tyto výsledky opravňují k předpokladu, že stran lokální toxicity je aplikace uridinové masti bezpečná, což je potvrzeno i klinickými zkušenostmi (Netikova et al. 2009).

Již v přítomnosti nízkých koncentrací uridinu se významně snižuje toxicita 5-FU. U každého z použitých testů se protektivní efekt uridinu projevil rozdílně. Při poměrně vysoké koncentraci 5-FU (50 µg/mL, 384 µM) byl v NTCA testu po 3 dnech zaznamenán protektivní efekt při koncentraci uridinu 30 µg/mL (123 µM) (obr. 17 a 18). V RTCA testech bylo opakovaně zaznamenáno



v přítomnosti 50-100 µg/mL uridinu cca o 2 dny delší přežití buněk stresovaných 5-FU (grafy 11, 13, 25 a 27). V případě, že byla použita koncentrace 7,5 µg/mL 5-FU nebyl zaznamenán v RTCA testu výrazný rozdíl mezi koncentracemi 50 µg/mL (205 µM) a 100 µg/mL (410 µM) uridinu. Pro uridinovou rescue při prevenci systémové toxicity bolusové aplikace 600 mg/m<sup>2</sup> 5-FU bylo v klinické studii klíčové dosažení hladin uridinu alespoň 50 µM (Kelsen et al. 1997). V našich pokusech byla koncentrace uridinu většinou čtyřnásobná (50 µg/mL, 205 µM). Poměry koncentrací 5-FU a uridinu v kůži pacientů s PPE, kteří topicky aplikují 10 % uridinovou mast nejsou známy a bez přímého stanovení nelze provést přesný odhad.

V MTT testech byla zaznamenána u buněk kultivovaných s 50 µg/mL (204,8 µM) uridinu a 7,5 µg/mL 5-FU (57,7 µM) pomalu klesající metabolická aktivita, která poklesla na nulu o několik dní později, než u kontrolních buněk s 5-FU bez uridinu (grafy 7-9, 17). Zdá se tedy, že buňky se dále nedělí, pouze přežívají v přítomnosti 5-FU déle. Metabolisace byla zachována po čtyřech dnech i v relativně vysokých koncentracích 5-FU (31,2 µg/mL, graf 8).

Zajímavých výsledků bylo dosaženo v MTT testu s koncentrací uridinu 750 µg/mL (3mM) a koncentrací 5-FU 7,5 µg/mL (57,7 µM), nebo 31,2 µg/mL (240 µM) (grafy 18, 19 a 24). Metabolická aktivita buněk byla zachována oproti kontrolám bez uridinu výrazně déle (10-13 dní). Zpočátku docházelo dokonce k mírnému nárůstu metabolické aktivity buněk s 5-FU a uridinem, která však od cca 5. dne stagnovala, zatímco aktivita kontrolních buněk bez 5-FU dále rostla. V publikovaných studiích při podobném poměru 5-FU a uridinu nebyla toxicita oproti kontrole zaznamenána vůbec, což může být způsobeno předčasným ukončením pokusů (Codacci-Pisanelli et al. 2008). V případě aplikace 10 % uridinové masti je při lokálním podání pravděpodobně dosaženo řádově vyšších lokálních koncentrací uridinu oproti 5-FU, což prodlužuje jeho protektivní efekt. Je třeba však mít na paměti, že při extrémně vysokých koncentracích uridinu se jeho toxicita v přítomnosti 5-FU může naopak zvyšovat. V našich pokusech jsme zjistili, že v přítomnosti 50 µg/mL 5-FU se projevila toxicita uridinu v koncentraci 12 mg/mL, což je koncentrace, ve které samotný uridin toxický není (obr. 5).

V případě, že u dané buněčné linie uridin snižuje toxicitu 5-FU, je možné ji opět zvýšit navýšením dávek 5-FU, což je popsáno *in vitro* (Codacci-Pisanelli et al. 2008) i *in vivo* na myších modelech (Codacci-Pisanelli et al. 1997). Při studiu protektivní účinnosti uridinu při léčbě 5-FU je tedy vhodné zaměřit se na poměr koncentrací obou látek, ve kterém se protektivní účinek projevuje. Pomocí tohoto poměru by potom bylo možné určit na základě znalosti dosažitelných hladin 5-FU minimální koncentraci uridinu, která bude při daném dávkování efektivní. V našich testech jsme na rozdíl od některých autorů (Codacci-Pisanelli et al. 2008) neměřili buněčnou proliferaci, ale morfologické změny, metabolickou aktivitu a adherenci buněk k podkladu. Je zřejmé, že buňky, které přežívají

v přítomnosti 5-FU díky uridinu sice nesnižují po určitou dobu metabolickou aktivitu, ale rovněž ji výrazně nezvyšují, na rozdíl od buněk kontrolních. Nelze tedy říci, že by došlo k plnému zabránění toxicity 5-FU (graf 8). Výsledky autorů Codacci-Pisanelli et al. popisují toxicitu 5-FU již při poměru molárních koncentrací 5-FU/uridin 0,05, při kterém docházelo k zástavě proliferace (Codacci-Pisanelli et al. 2008). V našem případě při poměru koncentrací 5-FU/uridin 0,5 docházelo k zástavě růstu metabolické aktivity a prodloužení přežití buněk, pokud byl tento poměr 0,02-0,08 (grafy 18 a 19), byl prvních 5 dnů zaznamenán nárůst metabolické aktivity (a vs i mírná proliferace buněk). Tento efekt byl výraznější, pokud byl k uridinu přidán thymidin (grafy 18, 19).

Z hlediska bezpečnosti terapie hraje zásadní roli vstřebávání uridinu přes kůži. Případné plasmatické hladiny uridinu by totiž mohly snižovat efektivitu antineoplastické terapie. Systémová absorpce uridinu by vzhledem k jeho  $\log P_{\text{octanol/voda}}$  s hodnotu -1,98 (tedy vysokou hydrofilitou) měla být minimální. Přestože transdermální penetrace bude malá je však třeba vyloučit přinejmenším na zvířecích modelech, že nedochází k významnému vstřebání při závažnějších projevech PPE, kdy dochází k erosím, ulceracím a poškození kožní bariéry. Výsledná formulace uridinové masti by měla zajišťovat dostatečnou koncentraci uridinu v kůži pro залечení PPE, ale neměla by vést ke zvýšené systémové expozici uridinu.

### 6.3. Thymidin

Fysiologické hladiny thymidinu jsou 0,04  $\mu\text{M}$ -0,87  $\mu\text{M}$  s významnou inter a intraindividuální variabilitou (Howell et al. 1981). Toxické koncentrace *in vitro* na kultivované buňky jsou velmi variabilní dle typu zkoumaných buněk a pohybují se od 62  $\mu\text{M}$  do 10 mM (O'Dwyer et al. 1987). V literatuře popsána toxická koncentrace thymidinu na nádorové buněčné linie lidského melanomu a karcinomu tračnicku je 1 mg/mL (4,1 mM). Při této koncentraci přežilo 72 hodin pouze 23 % nádorových buněk oproti 60 % buněk nenádorových (Lee et al. 1977). V našich experimentech jsme zaznamenali u HaCaT keratinocytů výraznou toxicitu thymidinu po 72 hodinách až v koncentraci 17,2 mg/mL (71 mM, obr. 20 a 21). V přítomnosti 50  $\mu\text{g/mL}$  (205  $\mu\text{M}$ ) 5-FU byl zaznamenán protektivní efekt až ve výrazně vyšších koncentracích thymidinu, než tomu bylo u uridinu. V koncentraci 1 mg/mL (4,1 mM) byl protektivní efekt pouze slabě vyjádřen, od koncentrace 3 mg/mL (12,39 mM) byl již výrazný a srovnatelný s 50  $\mu\text{g/mL}$  (205  $\mu\text{M}$ ) uridinu (obr. 22 a 23). Je možné, že v případě velmi vysoké koncentrace thymidinu (minimálně 20x větší, než molární koncentrace 5-FU) dochází v přebytku nukleosidů v buňce k blokádě anabolické dráhy pro syntézu 5-FdUTP, čímž dochází ke snížení toxicity 5-FU.

V dalších experimentech na buněčné linii HaCaT byl porovnáván protektivní efekt thymidinu přímým srovnáním s uridinem ve stejné koncentraci (100 µg/mL, 0,41 mM). Thymidin nevykazoval po 5 dnech výrazný protektivní efekt v NTCA testu (obr. 13 C). Toxické projevy expozice 5-FU byly na mikrofotografiích patrné po pěti dnech i v případě uridinu, nicméně byly méně vyjádřeny (obr. 13 B). V MTT testu zpomalil uridin pokles metabolické aktivity buněk v přítomnosti 7,5 µg/mL 5-FU oproti thymidinu asi o 3 dny. Buňky s thymidinem přestaly vykazovat metabolickou aktivitu stejně rychle, jako buňky, v jejichž médiu byl samotný 5-FU (graf 12). V RTCA testu byly tyto výsledky potvrzeny (graf 13), neboť zatímco uridin oddálil pokles cell indexu o cca 2 dny, cell index buněk ošetřených 5-FU a thymidinem poklesl po dvou dnech stejně rychle, jako u buněk kontrolních, které měly v médiu pouze 5-FU.

Zajímavé je, že hodnoty cell indexu buněk v přítomnosti thymidinu po přidání 5-FU nestoupají oproti hodnotám kontrolních buněk bez 5-FU tak, jak se tomu děje v případě všech dalších testovaných nukleosidů. Při přidání samotného thymidinu se tak křivka cell indexu zpočátku podobá kontrolním buňkám, nicméně poté rapidně poklesne ve stejnou dobu, jako klesá křivka buněk s 5-FU bez přidání nukleosidů (graf 13). Vlivem zásahu do syntesy DNA zastavuje thymidin dělení buněk a tohoto účinku je využíváno *in vitro* k synchronisaci buněčného cyklu v S-fázi (Xeros 1962). Zástavy buněčného cyklu je dosaženo inhibicí ribonukleotid reduktasy nadměrným množstvím thymidintrifosfátu (TTP) a následnou deplecí deoxycytidintrifosfátu (dCTP) a poruše rovnováhy mezi TTP a dCTP (Akman et al. 1981; Fox et al. 1980; Martin et al. 1980). Tento účinek by mohl vést k nižšímu nárůstu cell indexu, nicméně proti této hypotese stojí fakt, že k nárůstu cell indexu nedochází ani u kontrolních buněk a že deoxycytidin nezvyšuje významně metabolickou aktivitu buněk v přítomnosti 5-FU a thymidinu (graf 26).

Mechanismus účinku 5-FU se u různých buněčných linií liší (Umeda and Heidelberger 1968; van Groeningen et al. 1992). Podle dříve publikovaných studií vede přidání uridinu k buňkám stresovaným 5-FU k zabránění jeho inkorporace do RNA (Codacci-Pisanelli et al. 2008; Sawyer et al. 1984). Naopak podáním thymidinu je možno obejít inhibici TS 5-fluorouracilem (Umeda and Heidelberger 1968). Účinek těchto nukleosidů v přítomnosti 5-FU tedy u konkrétní buněčné linie objasňuje, jakým mechanismem 5-FU účinkuje. *Mechanismus toxicity 5-FU u lidských keratinocytů spočívá především v inkorporaci 5-FU do RNA, neboť uridin snižuje toxické projevy 5-FU, na rozdíl od thymidinu, který toxicitu 5-FU významněji neovlivňuje.*

## 6.4. Kombinace uridinu a thymidinu

V našich pokusech kombinace thymidinu a uridinu výrazně prodlužovala přežívání buněk v přítomnosti 5-FU a udržovala jejich vyšší metabolickou aktivitu. Tento účinek byl výraznější v případě kombinace uridinu a thymidinu, než u každého z těchto nukleosidů zvlášť. Kromě delší doby do poklesu cell indexu je přidáním thymidinu k uridinu rovněž zabráněno počátečnímu nárůstu cell indexu, který je pravděpodobně způsoben stresovou reakcí buněk na přítomnost 5-FU. V RTCA testu bylo zjištěno, že tento efekt může být plně rozvinut až v případě, že molární koncentrace uridinu ve směsi je více, než 2x vyšší, oproti koncentraci 5-FU (graf 15). Pokud je tato podmínka splněna, dochází po přidání thymidinu k výraznému prodloužení času do poklesu cell indexu (graf 15, 24 a 29). Nejlepších výsledků je pak dosaženo, pokud je koncentrace thymidinu equimolární, nebo nižší, než koncentrace uridinu, nicméně rozdíly v účinku mezi jednotlivými poměry koncentrací nukleosidů jsou relativně malé (graf 15). Pokud byla molární koncentrace uridinu méně, než 2x vyšší, oproti koncentraci 5-FU, docházelo ve všech testovaných kombinacích koncentrací uridinu a thymidinu ke stejnému efektu, jako u uridinu samotného (graf 16). Výsledky z RTCA testu byly potvrzeny i MTT testy, kdy buňky ošetřené kombinací uridinu a thymidinu vykazovaly delší přežití a/nebo vyšší metabolickou aktivitu, než buňky ošetřené samotným uridinem (grafy 17-19, srovnání grafů 22 a 23, grafy 24 a 26). V případě použití vysokých koncentrací nukleosidů v MTT testu (500 µg/mL (2,05 mM) uridinu a 250 µg/mL (1,03 mM) thymidinu) narostla metabolická aktivita buněk sigifikantně více, než při použití samotného uridinu v koncentraci 750 µg/mL (3mM) a první 3 dny v podstatě vývoj metabolické aktivity buněk s kombinací 5-FU + uridin + thymidin kopíroval vývoj metabolické aktivity kontrolních buněk bez 5-FU. Poté stagnoval (na vyšších hodnotách, než v případě 5-FU + uridinu samotného) do 8. dne a následně začal klesat. (grafy 18 a 19). Podobný synergický efekt kombinace uridinu a thymidinu byl zaznamenán i v NTCA testu (obr. 25).

*Vzhledem k tomu, že thymidin samotný není efektivní jako antidotum proti toxickým projevům 5-FU u HaCaT keratinocytů, lze uzavřít, že inhibice TS se neuplatňuje jako mechanismus toxicity u těchto buněk. Pokud však je přidán do média uridin zároveň s thymidinem, dochází k výraznému prodloužení přežívání buněk a zvýšení jejich metabolické aktivity oproti buňkám s uridinem samotným. Z toho lze vyvodit, že v případě, že dojde k zablokování primárního mechanismu účinku (inkorporace 5-FU do RNA) uridinem, začne se uplatňovat jako hlavní mechanismus toxicity inhibice TS. Pokud je následně snížen význam inhibice TS přidáním thymidinu, dochází k výraznému prodloužení přežití. Pro ověření této hypotézy byly provedeny pokusy s kalciumfolinátem.*

## 6.5. Kalciumfolinát

Rovněž případný efekt kalciumfolinátu umožní určit přesněji mechanismus účinku 5-FU u konkrétní buněčné linie, neboť ke zvýšení toxicity 5-FU může dojít pouze, pokud významným mechanismem účinku 5-FU je inhibice TS, která je v přítomnosti CF posílená (Codacci-Pisanelli et al. 2008; Longley et al. 2003). Zatímco Codacci-Pisanelli et al popisují u buněk myšího nádoru tlustého střeva (C26-10) zvýšenou toxicitu 5-FU v přítomnosti CF a pouze parciální uridinovou rescue v případě kombinace 5-FU a CF (Codacci-Pisanelli et al. 2008), v našich experimentech jsme neprokázali vliv CF na toxicitu samotného 5-FU (grafy 21, 24 a 25). *Toto zjištění potvrzuje, že primární mechanismus toxicity 5-FU v nepřítomnosti uridinu není inhibice TS.*

Pomocí MTT testu a RTCA testu jsme zaznamenali vyšší toxicitu 5-FU, pokud byl do média přidán CF současně s uridinem (grafy 22 a 25). Toto zjištění potvrzuje, že v přítomnosti uridinu inhibice TS nabývá na významu. Pokud bychom chtěli zařadit HaCaT keratinocyty do skupin podle citlivosti na 5-FU v přítomnosti CF a uridinu (viz sekce 2.3.2, odstavec o uridinu), lze konstatovat, že jsou podobné buněčné linii SW948 (graf 1B – buňky lidského karcinomu tračnicku).

Pokud byl buňkám s uridinem a CF dodán rovněž thymidin, došlo k opětovnému vymizení efektu CF, neboť inhibice TS ztrácí význam v nadbytku thymidinu. Zároveň buňky přežívaly výrazně déle a vykazovaly vyšší metabolickou aktivitu, neboť došlo k zablokování dvou různých mechanismů účinku 5-FU (grafy 23, 24 a 25). Codacci-Pisanelli sice uvádějí, že přidáním CF je možno „přepnout“ účinek 5-FU na TS inhibici (Codacci-Pisanelli et al. 2008), to jsme ale v našich experimentech neprokázali. Naopak jsme prokázali, že k tomuto „přepnutí“ se hodí uridin, který zablokuje druhý hlavní mechanismus účinku 5-FU, tedy inkorporaci 5-FU do RNA.

Otázkou zůstává, zda thymidin způsobuje pouze snížení významu inhibice TS 5-fluorouracilem, která podle signifikantního, ale relativně malého vlivu CF má na přežívání buněk spíše malý vliv. Vzhledem k výraznému efektu thymidinu (grafy 15, 17, 23, 25, 26, 28, 29 a obr. 25) se zdá, že může působit více různými mechanismy, např. zabraňuje inkorporaci 5-FU do DNA, kterou považují někteří autoři rovněž za významný mechanismus účinku 5-FU. Tento mechanismus byl však významný především u buněk s deficiencí v účinku *Smug1* DNA glykosylasy (An et al. 2007). Nepředpokládáme, že DNA inkorporace je významným mechanismem účinku u lidských keratinocytů HaCaT, neboť nepředpokládáme, že jsou *Smug1* deficientní.

An et al. považují dle experimentů na myších fibroblastech za významný mechanismus účinku právě inkorporaci 5-FU do DNA. Naopak zpochybňují vliv TS inhibice. Ve svých pokusech vytvořili buňky defektní ve dvou uridin-DNA glykosylasách a zjistili, že enzym *Smug1* hraje klíčovou roli při



inkorporaci 5-FU do DNA (An et al. 2007). Jak častý je výskyt deficitu *Smug1* v klinické praxi nelze jednoduše odhadnout, některé studie potvrzují agresivní chování nádorů prsu s nízkou expresí genu pro *Smug1* (Abdel-Fatah et al. 2013). Každopádně tato hypotéza nevysvětluje pozorování, že kalciumfolinát zvyšuje účinnost 5-FU. Zdá se tedy, že autoři vytvořili knock-outem *Smug1* nový mechanismus účinku 5-FU, který má v reálné klinické praxi pouze omezený význam, případně je významný pouze u omezeného množství nádorů, což je v souladu se skutečností, že různé buňky, ať již buňky zdravých tkání, nebo buňky nádorové mohou mít zcela rozdílné mechanismy účinku 5-FU.

Dalším pokusem, kdy byla zkoumána koncentrace 40 µg/mL (84,4 µM) CF byl MTT test, ve kterém jsme zkoušeli efekt 31,2 µg/mL (240 µM) 5-FU a protektivní účinek koncentrací uridinu 500 mg/mL (2,05 mM), nebo kombinací 500 mg/mL uridinu a 250 mg/mL thymidinu (0,99 mM). Výsledný graf 24 ukazuje téměř totožný průběh křivek znázorňujících metabolickou aktivitu u buněk s CF a bez CF ve všech testovaných kombinacích (tedy i v případě 5-FU a uridinu). Pravděpodobně při vyšší koncentraci 5-FU dochází k vysycení všech TS v buňce a další přidání CF nemá aditivní efekt (Codacci-Pisanelli et al. 2008).

Zvolené koncentrace CF v našich pokusech byly 2x vyšší, než koncentrace dosahované v plasmě u pacientů léčených dvouhodinovou infusí CF v dávce 500 mg/m<sup>2</sup> v kombinaci s bolusem 5-FU (např. terapeutické režimy FOLFOX a FOLFIRI) (Trave et al. 1988) a cca 4x vyšší, než koncentrace použité v *in vitro* studii Codacci-Pisanelli et al. (Codacci-Pisanelli et al. 2008). Modelování efektu CF je však relativně obtížné, neboť vzhledem ke složitému mechanismu kumulace uvnitř buněk nesouvisí pouze s jeho extracelulární koncentrací, ale rovněž s metodou podání, přičemž inhibice TS při terapii kombinací 5-FU a CF je při kontinuální pětidenní infusi CF o polovinu menší, než při dvouhodinové infusi (Trave et al. 1988).

## 6.6. Další nukleosidy

Poměrně překvapivé bylo zjištění, že uridin je možné beze změny protektivního účinku nahradit stejnou koncentrací cytidinu (obr. 26, grafy 26-28). Protektivní efekt cytidinu lze vysvětlit jeho konversí na uridin cytidintrifosátsynthetasou 2 (CTPS2). CTPS2 metabolisuje přeměnu uridintrifosátu (UTP) na cytidintrifosát (CTP) a zpět. Inhibice tohoto enzymu má podobný protektivní efekt na xenografty a buňky *in vitro* pěstované v přítomnosti 5-FU, jako přidání uridinu. Může to být způsobeno akumulací UTP při inhibici CTPS2 a následnou kompeticí s FdUTP o zabudování do RNA (Tan et al. 2011).

Při srovnávání efektu všech čtyř pyrimidinových nukleosidů (uridin, thymidin, cytidin a deoxycytidin) prokázaly cytidin a uridin vyšší účinnost, než thymidin a deoxycytidin (grafy 26 a 27). Deoxycytidin neprojevil žádný protektivní efekt a na rozdíl od thymidinu ani nesnižoval počáteční nárůst cell indexu v RTCA testu. Křivka buněk s deoxycytidinem tak věrně kopírovala křivku buněk se samotným 5-FU (graf 27). Kombinace cytidinu s thymidinem prodlužuje viabilitu buněk stejně jako kombinace uridinu s thymidinem (srovnej graf 28 a 29). Tento efekt je synergický, na rozdíl od aditivního efektu, kterého je dosaženo kombinací cytidinu s uridinem (obr. 26C) (Hartinger et al. 2015).

Positivní vliv cytidinu na toxicitu 5-FU u HaCaT keratinocytů je zcela v rozporu s výsledky pokusů na buňkách lidského kolorektálního karcinomu WiDr, u kterých nezabránil krátkodobě aplikovaný cytidin na rozdíl od uridinu inkorporaci 5-FU do RNA (van Groeningen et al. 1992). Přestože v našich pokusech vyšel cytidin jako ekvivalentně účinné antidotum při terapii 5-FU, není tento nukleosid vhodnou náhradou za uridin při lokální terapii PPE z praktických důvodů, neboť má nižší stabilitu, než uridin a je třeba jej uchovávat v chladu, což činí opakovanou aplikaci masti komplikovanější a pravděpodobně by tato nutnost vedla k nižší compliance pacientů.

Vzhledem k tomu, že deoxycytidin nezlepšuje významně metabolickou aktivitu buněk v přítomnosti thymidinu a 5-FU (graf 26), není pravděpodobně důvodem krátkého přežívání buněk v přítomnosti 5-FU a thymidinu vlastní toxicita thymidinu, která je způsobena inhibicí ribonukleotid reduktasy, vede k depleci deoxycytidinu a je reversibilní.

## 6.7. Další testovaná potenciální antidota

Jako potenciální antidotum byl zkoušen také uracil, který inhibuje enzym odbourávající 5-FU dihydropyridin dehydrogenasu (DPD) (Longley et al. 2003; Yen-Revollo et al. 2008). Naše výsledky potvrzují malý protektivní efekt, který je výrazně méně vyjádřen, než v případě uridinu (grafy 30-32). Tento efekt a může být spojen buď s inhibicí DPD a následnou nižší produkcí degradačních produktů 5-FU, které podle některých autorů mohou stát za projevem toxicity 5-FU (Yen-Revollo et al. 2008; Zhang et al. 2012), nebo s využitím uracilu pro syntézu uridinu pomocí salvage pathway. Vzhledem k nízké účinnosti *in vitro* předpokládáme také, že v probíhající studii (ClinicalTrials.gov identifikace: NCT01100463) s 0,1 % uracilovou mastí v léčbě PPE nebude dosaženo významných úspěchů (1 % uracilová mast je registrována jako patent US 20050215514 A1).

Vzhledem k tomu, že některé studie se zabývaly také možným protektivním efektem pyridoxinu v léčbě PPE (Kang et al. 2010; Ota et al. 2014), testovali jsme rovněž toto antidotum na HaCaT

keratinocytech v přítomnosti 7,5 µg/mL (57,7 µM) 5-FU (graf 33). V souhlasu s klinickými studiemi (Kang et al. 2010; Ota et al. 2014) jsme nezaznamenali v *in vitro* RTCA testu žádný protektivní efekt pyridoxinu (graf 33).

## 6.8.Primární keratinocyty

Byly rovněž testovány primární keratinocyty, které na rozdíl od buněk linie HaCaT přežily až do 7. dne v koncentraci 15,6 mg/mL 5-FU (120 µM) (obr. 27 a 31). Pro tyto buňky byl rovněž prokázán protektivní efekt uridinu v přítomnosti 5-FU. Uridin v koncentraci 10 mg/mL (41,3 mM) významně zvyšoval odolnost primárních keratinocytů, takže ani v koncentraci 62,5 µg/mL (480 µM) 5-FU nebyl po pěti dnech zaznamenán toxický efekt 5-FU. I po sedmi dnech přežívalo v koncentraci 31,2 µg/mL (240 µM) 5-FU v přítomnosti uridinu výrazně více buněk, než bez tohoto protektivního agens (obr 31). Naše výsledky tedy popisují, že *primární keratinocyty jsou méně citlivé na 5-FU, než keratinocyty linie HaCaT a že u těchto buněk se projevuje protektivní efekt uridinu.*

## 7. Závěr

PPE je v současné době jedním z nejvýznamnějších nežádoucích účinků terapie fluoropyrimidiny (Lokich et al. 1989; Wolpin and Mayer 2008). Metodou volby v léčbě tohoto nežádoucího účinku je snížení dávky vyvolávajícího cytostatika (SPC\_Xeloda 2006), nicméně v některých případech je nutné terapii pro závažnost PPE přerušit, čímž může dojít ke ztrátě účinné léčebné modality. Na Onkologické klinice Všeobecné fakultní nemocnice v Praze se od roku 2007 používá 10 % uridinová mast s klinickými úspěchy. Dle subjektivního hodnocení pacientů dochází ke zmírnění až odeznění projevů PPE u 2/3 pacientů (Netikova et al. 2009). Vzhledem k tomu, že efektivita této léčby není v literatuře spolehlivě doložena objektivními metodami, nelze však vyloučit vliv placebo efektu. Dále nelze vyloučit terapeutický efekt samotného masťového základu (cremor neoquasorb). Z tohoto důvodu jsme si kladli za cíl ověřit *in vitro* efekt uridinu při aplikaci 5-FU na lidské keratinocyty. Zároveň jsme si kladli za cíl odhalit molekulární podstatu toxicity 5-FU na lidské keratinocyty, aby bylo možné na základě těchto informací cíleně vyvinout co nejefektivnější prostředek k lokální terapii PPE. Měřili jsme toxicitu 5-FU v přítomnosti různých modulátorů jeho účinku především uridinu, thymidinu a kalciumfolinátu. Za tímto účelem jsme použili 3 různé testy viability buněk: RTCA test umožňující průběžné měření adherence buněk k podkladu (Bonifas et al. 2010), MTT test umožňující měřit metabolickou aktivitu buněk (Mosmann 1983) a NTCA test umožňující zjišťovat morfologické odchylky při působení cytotoxických látek (Netikova et al. 2007).

V našich testech bylo potvrzeno, že uridin významně prodlužuje přežití buněk v přítomnosti 5-FU a antagonizuje jeden z hlavních mechanismů působení 5-FU, tedy jeho inkorporaci do RNA (Codacci-Pisanelli et al. 2008; Hartinger et al. 2012; Hartinger et al. 2015; Sawyer et al. 1984). Tyto výsledky svědčí pro to, že inkorporace 5-FU do RNA je jeho základním mechanismem toxicity. Za velice cenné považujeme potvrzení těchto výsledků rovněž na primárních keratinocytech. Pokud nebyl v médiu testovaných buněk uridin, inhibice TS se v rozvoji toxicity 5-FU u HaCaT keratinocytů neuplatňovala, neboť přidání thymidinu k buňkám nesnižovalo toxicitu 5-FU a přidání CF toxicitu 5-FU nezvyšovalo. Modulační aktivita thymidinu a CF se však u některých buněčných linií významně mění v přítomnosti uridinu, neboť zde dochází ke změně mechanismu toxického působení 5-FU z inkorporace do RNA na inhibici TS (Codacci-Pisanelli et al. 2008). Zjistili jsme, že k tomuto efektu dochází rovněž u lidských keratinocytů buněčné linie HaCaT. V přítomnosti uridinu byla toxicita 5-FU zesilována přidáním CF a bylo možné ji výrazně snížit přidáním thymidinu (Hartinger et al. 2012). Primární mechanismus toxicity 5-FU u HaCaT keratinocytů je tedy inkorporace do RNA. Tento mechanismus může být „přepnut“ přidáním uridinu na inhibici TS. Protektivní efekt je výrazně více vyjádřen, pokud jsou

antagonisovány oba dva hlavní mechanismy účinku 5-FU (RNA inkorporace a inhibice TS) při aplikaci uridinu a thymidinu zároveň.

Překvapením byla účinnost cytidinu, který byl v literatuře popsán v prevenci inkorporace 5-FU do RNA jako neúčinný (van Groeningen et al. 1992). V našich pokusech však prokázal cytidin stejný protektivní efekt, jako uridin. Deoxycytidin neprokázal žádný protektivní efekt, ani nezvyšoval protektivní účinek thymidinu. Toto zjištění svědčí pro to, že inhibice ribonukleotidreduktasy nadměrným množstvím thymidinu a následná deplece ostatních pyrimidinových nukleosidů se v případě HaCaT keratinocytů neuplatňuje (Hartinger et al. 2015). Dále jsme testovali uracil a pyridoxin. Uracil prokázal pouze velice malý protektivní efekt. Pyridoxin neprokázal žádný efekt, čímž se potvrdily i výsledky starších klinických studií (Kang et al. 2010; Ota et al. 2014).

Při měření viability jsme použili 3 různé metody. Vzhledem k tomu, že toxicita 5-FU se projevuje až po 48 hodinách a rozdíl mezi účinkem jednotlivých antidot může být po určitou dobu neměřitelný, neboť se neprojevuje zvýšeným nárůstem, ale spíše prodlouženým přežitím buněk, zdůrazňujeme, že je třeba měřit viabilitu v čase. Jako velice přínosné se jeví kombinovat více metod testování viability. Pomocí výsledků MTT testů jsme např. korigovali výsledky RTCA testů, ve kterých všechny buňky v nepřítomnosti thymidinu po expozici 5-FU zvýšily cell index. Metabolická aktivita v MTT testech však zůstala nezměněna, takže se nejedná o zvýšený nárůst buněk, ale spíše o projev stresové reakce vyvolané aplikací 5-FU, který je zaznamenán citlivou metodou při změně povrchových vlastností stresovaných buněk. Tento efekt nebyl měřitelný jinou metodou, než RTCA a došlo k jeho vymizení po přidání thymidinu (ať již samotného, nebo v kombinaci s dalšími nukleosidy). Tuto změnu by nebylo možné zaznamenat, pokud bychom používali pouze MTT a NTCA testy.

Jako praktický výsledek našich testů navrhuji pro design případných klinických studií za účelem zvýšení efektivity terapie přidat do ochranné masti pro terapii PPE thymidin v koncentraci stejné, nebo poloviční oproti koncentraci uridinu. Dojde tak k antagonisování obou hlavních mechanismů účinku 5-FU a lze tedy očekávat větší terapeutickou účinnost. Záměna uridinu za cytidin by pravděpodobně vedla ke stejné terapeutické účinnosti, nicméně manipulace s výsledným přípravkem by byla složitější pro nižší stabilitu cytidinu (nutnost uchovávat v chladu), čímž by se pravděpodobně snižovala compliance pacientů.



## 8. Literatura

- Abdel-Fatah, T. M., Albarakati, N., Bowell, L., Agarwal, D., Moseley, P., Hawkes, C., Ball, G., Chan, S., Ellis, I. O., and Madhusudan, S. (2013). "Single-strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase (SMUG1) deficiency is linked to aggressive breast cancer and predicts response to adjuvant therapy." *Breast Cancer Res Treat*, 142(3), 515-527.
- Advanced\_Colorectal\_Cancer\_Meta-Analysis\_Project (1992). "Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate." *J Clin Oncol*, 10(6), 896-903.
- Akman, S. A., Ross, D. D., Rosen, H., Salinger, C., Andrews, P. A., Chou, F. E., and Bachur, N. R. (1981). "Growth inhibition by thymidine of leukemic HL-60 and normal human myeloid progenitor cells." *Cancer Res*, 41(6), 2141-2146.
- Al Safarjalani, O. N., Rais, R., Naguib, F. N., and el Kouni, M. H. (2012). "Potent combination therapy for human breast tumors with high doses of 5-fluorouracil: remission and lack of host toxicity." *Cancer Chemother Pharmacol*, 69(6), 1449-1455.
- Al Safarjalani, O. N., Rais, R., Shi, J., Schinazi, R. F., Naguib, F. N., and el Kouni, M. H. (2006). "Modulation of 5-fluorouracil host-toxicity and chemotherapeutic efficacy against human colon tumors by 5-(Phenylthio)acyclouridine, a uridine phosphorylase inhibitor." *Cancer Chemother Pharmacol*, 58(5), 692-698.
- An, Q., Robins, P., Lindahl, T., and Barnes, D. E. (2007). "5-Fluorouracil incorporated into DNA is excised by the Smug1 DNA glycosylase to reduce drug cytotoxicity." *Cancer Res*, 67(3), 940-945.
- Atienzar, F. A., Tilmant, K., Gerets, H. H., Toussaint, G., Speeckaert, S., Hanon, E., Depelchin, O., and Dhalluin, S. (2011). "The use of real-time cell analyzer technology in drug discovery: defining optimal cell culture conditions and assay reproducibility with different adherent cellular models." *J Biomol Screen*, 16(6), 575-587.
- Bagrij, T., Kralovanszky, J., Gyergyay, F., Kiss, E., and Peters, G. J. (1993). "Influence of uridine treatment in mice on the protection of gastrointestinal toxicity caused by 5-fluorouracil." *Anticancer Res*, 13(3), 789-793.
- Benson, H. A. (2005). "Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques." *Curr Drug Deliv*, 2(1), 23-33.
- Bielas, J. H., Schmitt, M. W., Icreverzi, A., Ericson, N. G., and Loeb, L. A. (2009). "Molecularly evolved thymidylate synthase inhibits 5-fluorodeoxyuridine toxicity in human hematopoietic cells." *Hum Gene Ther*, 20(12), 1703-1707.

- Biganzoli, L., Martin, M., and Twelves, C. (2002). "Moving forward with capecitabine: a glimpse of the future." *Oncologist*, 7 Suppl 6, 29-35.
- Blaschke, M., Blumberg, J. u., Wegner, U., Nischwitz, M., Ramadori, G., and Cameron, S. (2012). "Measurements of 5-FU Plasma Concentrations in Patients with Gastrointestinal Cancer: 5-FU Levels Reflect the 5-FU Dose Applied." *Journal of Cancer Therapy*, 3(1), 28-36.
- Bocci, G., Danesi, R., Di Paolo, A. D., Innocenti, F., Allegrini, G., Falcone, A., Melosi, A., Battistoni, M., Barsanti, G., Conte, P. F., and Del Tacca, M. (2000). "Comparative pharmacokinetic analysis of 5-fluorouracil and its major metabolite 5-fluoro-5,6-dihydrouracil after conventional and reduced test dose in cancer patients." *Clin Cancer Res*, 6(8), 3032-3037.
- Bonifas, J., Scheitza, S., Clemens, J., and Blomeke, B. (2010). "Characterization of N-acetyltransferase 1 activity in human keratinocytes and modulation by para-phenylenediamine." *J Pharmacol Exp Ther*, 334(1), 318-326.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N. E. (1988). "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." *J Cell Biol*, 106(3), 761-771.
- Codacci-Pisanelli, G., Kralovanszky, J., van der Wilt, C. L., Noordhuis, P., Colofiore, J. R., Martin, D. S., Franchi, F., and Peters, G. J. (1997). "Modulation of 5-fluorouracil in mice using uridine diphosphoglucose." *Clin Cancer Res*, 3(2), 309-315.
- Codacci-Pisanelli, G., Noordhuis, P., van der Wilt, C. L., and Peters, G. J. (2008). "Selective protection by uridine of growth inhibition by 5-fluorouracil (5FU) mediated by 5FU incorporation into RNA, but not the thymidylate synthase mediated growth inhibition by 5FU-leucovorin." *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 27(6), 733-739.
- Engstrom, P. F., Arnoletti, J. P., Benson, A. B., 3rd, Chen, Y. J., Choti, M. A., Cooper, H. S., Covey, A., Dilawari, R. A., Early, D. S., Enzinger, P. C., Fakih, M. G., Fleshman, J., Jr., Fuchs, C., Grem, J. L., Kiel, K., Knol, J. A., Leong, L. A., Lin, E., Mulcahy, M. F., Rao, S., Ryan, D. P., Saltz, L., Shibata, D., Skibber, J. M., Sofocleous, C., Thomas, J., Venook, A. P., and Willett, C. (2009). "NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: colon cancer." *J Natl Compr Canc Netw*, 7(8), 778-831.
- Fox, R. M., Tripp, E. H., and Tattersall, M. H. (1980). "Mechanism of deoxycytidine rescue of thymidine toxicity in human T-leukemic lymphocytes." *Cancer Res*, 40(5), 1718-1721.
- Goldhirsch, A., Coates, A. S., Colleoni, M., Castiglione-Gertsch, M., and Gelber, R. D. (1998). "Adjuvant chemoendocrine therapy in postmenopausal breast cancer: cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil dose and schedule may make a difference. International Breast Cancer Study Group." *J Clin Oncol*, 16(4), 1358-1362.

- Hajduch, M., Mihal, V., Minarik, J., Faber, E., Safarova, M., Weigl, E., and Antalek, P. (1996). "Decreased in vitro chemosensitivity of tumour cells in patients suffering from malignant diseases with poor prognosis." *Cytotechnology*, 19(3), 243-245.
- Hartinger, J., Vesely, P., Matouskova, E., Argalacsova, S., Petruzalka, L., and Netikova, I. (2012). "Local treatment of hand-foot syndrome with uridine/thymidine: in vitro appraisal on a human keratinocyte cell line HaCaT." *ScientificWorldJournal*, 2012, 421325.
- Hartinger, J., Vesely, P., Netikova, I., Matouskova, E., and Petruzalka, L. (2015). "The protective effect of pyrimidine nucleosides on human HaCaT keratinocytes treated with 5-FU." *Anticancer Res*, 35(3), 1303-1310.
- Hartmann, H. R., and Bollag, W. (1986). "Modulation of the effects of fluoropyrimidines on toxicity and tumor inhibition in rodents by uridine and thymidine." *Med Oncol Tumor Pharmacother*, 3(2), 111-118.
- Hoesly, F. J., Baker, S. G., Gunawardane, N. D., and Cotliar, J. A. (2011). "Capecitabine-induced hand-foot syndrome complicated by pseudomonal superinfection resulting in bacterial sepsis and death: case report and review of the literature." *Arch Dermatol*, 147(12), 1418-1423.
- Hofheinz, R. D., Heinemann, V., von Weikersthal, L. F., Laubender, R. P., Gencer, D., Burkholder, I., Hochhaus, A., and Stintzing, S. (2012). "Capecitabine-associated hand-foot-skin reaction is an independent clinical predictor of improved survival in patients with colorectal cancer." *Br J Cancer*, 107(10), 1678-1683.
- Howell, S. B., Mansfield, S. J., and Taetle, R. (1981). "Significance of variation in serum thymidine concentration for the marrow toxicity of methotrexate." *Cancer Chemother Pharmacol*, 5(4), 221-226.
- Ilyas, S., Wasif, K., and Saif, M. W. (2014). "Topical henna ameliorated capecitabine-induced hand-foot syndrome." *Cutan Ocul Toxicol*, 33(3), 253-255.
- Janusch, M., Fischer, M., Marsch, W., Holzhausen, H. J., Kegel, T., and Helmbold, P. (2006). "The hand-foot syndrome--a frequent secondary manifestation in antineoplastic chemotherapy." *Eur J Dermatol*, 16(5), 494-499.
- Juergen, B. (2004). "Letter to the editor - 5-FU induced palmar-plantar erythrodyesthesia – a hospital pharmacy developed "antidot." " *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. , 10(57).
- Kamoshida, S., Matsuoka, H., Ishikawa, T., Maeda, K., Shimomura, R., Inada, K., and Tsutsumi, Y. (2004). "Immunohistochemical evaluation of thymidylate synthase (TS) and p16INK4a in advanced colorectal cancer: implication of TS expression in 5-FU-based adjuvant chemotherapy." *Jpn J Clin Oncol*, 34(10), 594-601.
- Kang, Y. K., Lee, S. S., Yoon, D. H., Lee, S. Y., Chun, Y. J., Kim, M. S., Ryu, M. H., Chang, H. M., Lee, J. L., and Kim, T. W. (2010). "Pyridoxine is not effective to prevent hand-foot syndrome associated

- with capecitabine therapy: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study." *J Clin Oncol*, 28(24), 3824-3829.
- Kaufman, E. R. (1984). "Resistance to 5-fluorouracil associated with increased cytidine triphosphate levels in V79 Chinese hamster cells." *Cancer Res*, 44(8), 3371-3376.
- Kelsen, D. P., Martin, D., O'Neil, J., Schwartz, G., Saltz, L., Sung, M. T., von Borstel, R., and Bertino, J. (1997). "Phase I trial of PN401, an oral prodrug of uridine, to prevent toxicity from fluorouracil in patients with advanced cancer." *J Clin Oncol*, 15(4), 1511-1517.
- Kornmann, M., Staib, L., Wiegelt, T., Kreuser, E. D., Kron, M., Baumann, W., Henne-Bruns, D., and Link, K. H. (2010). "Adjuvant chemoradiotherapy of advanced resectable rectal cancer: results of a randomised trial comparing modulation of 5-fluorouracil with folinic acid or with interferon-alpha." *Br J Cancer*, 103(8), 1163-1172.
- Krasna, L., Netikova, I., Chaloupkova, A., Taislova, E., Zimovjanova, M., Vesely, P., Danes, J., Petruzalka, L., and Matouskova, E. (2003). "Assessment of in vitro drug resistance of human breast cancer cells subcultured from biopsy specimens." *Anticancer Res*, 23(3b), 2593-2599.
- Kreuser, E. D., Wadler, S., and Thiel, E. (1995). "Biochemical modulation of cytotoxic drugs by cytokines: molecular mechanisms in experimental oncology." *Recent Results Cancer Res*, 139, 371-382.
- Kroep, J. R., van Werkhoven, E., Polee, M., van Groeningen, C. J., Beeker, A., Erdkamp, F., Weijl, N., van Bochove, A., Erjavec, Z., Kapiteijn, E., Stiggelbout, A. M., Nortier, H. W., and Gelderblom, H. (2015). "Randomised study of tegafur-uracil plus leucovorin versus capecitabine as first-line therapy in elderly patients with advanced colorectal cancer--TLC study." *J Geriatr Oncol*, 6(4), 307-315.
- Lee, S. S., Giovanella, B. C., and Stehlin, J. S., Jr. (1977). "Selective lethal effect of thymidine on human and mouse tumor cells." *J Cell Physiol*, 92(3), 401-405.
- Lenz, H. J., Leichman, C. G., Danenberg, K. D., Danenberg, P. V., Groshen, S., Cohen, H., Laine, L., Crookes, P., Silberman, H., Baranda, J., Garcia, Y., Li, J., and Leichman, L. (1996). "Thymidylate synthase mRNA level in adenocarcinoma of the stomach: a predictor for primary tumor response and overall survival." *J Clin Oncol*, 14(1), 176-182.
- Leonard, R., Hennessy, B. T., Blum, J. L., and O'Shaughnessy, J. (2011). "Dose-adjusting capecitabine minimizes adverse effects while maintaining efficacy: a retrospective review of capecitabine for metastatic breast cancer." *Clin Breast Cancer*, 11(6), 349-356.
- Leyva, A., van Groeningen, C. J., Kraal, I., Gall, H., Peters, G. J., Lankelma, J., and Pinedo, H. M. (1984). "Phase I and pharmacokinetic studies of high-dose uridine intended for rescue from 5-fluorouracil toxicity." *Cancer Res*, 44(12 Pt 1), 5928-5933.

- Lin, E., Morris, J. S., and Ayers, G. D. (2002). "Effect of celecoxib on capecitabine-induced hand-foot syndrome and antitumor activity." *Oncology (Williston Park)*, 16(12 Suppl No 14), 31-37.
- Lokich, J. J., Ahlgren, J. D., Gullo, J. J., Philips, J. A., and Fryer, J. G. (1989). "A prospective randomized comparison of continuous infusion fluorouracil with a conventional bolus schedule in metastatic colorectal carcinoma: a Mid-Atlantic Oncology Program Study." *J Clin Oncol*, 7(4), 425-432.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., and Johnston, P. G. (2003). "5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies." *Nat Rev Cancer*, 3(5), 330-338.
- Martin, D. S., Stolfi, R. L., Sawyer, R. C., Nayak, R., Spiegelman, S., Young, C. W., and Woodcock, T. (1980). "An overview of thymidine." *Cancer*, 45(5 Suppl), 1117-1128.
- Martin, D. S., Stolfi, R. L., Sawyer, R. C., Spiegelman, S., and Young, C. W. (1982). "High-dose 5-fluorouracil with delayed uridine "rescue" in mice." *Cancer Res*, 42(10), 3964-3970.
- Martschick, A., Sehouli, J., Patzelt, A., Richter, H., Jacobi, U., Oskay-Ozelik, G., Sterry, W., and Lademann, J. (2009). "The pathogenetic mechanism of anthracycline-induced palmar-plantar erythrodysesthesia." *Anticancer Res*, 29(6), 2307-2313.
- Matouskova, E., Dudorkinova, D., Krasna, L., and Vesely, P. (2000). "Temporal in vitro expansion of the luminal lineage of human mammary epithelial cells achieved with the 3T3 feeder layer technique." *Breast Cancer Res Treat*, 60(3), 241-249.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Netikova, I., Bursikova, E., Vesely, P., Prchalova, M., Kleibl, Z., and Matouskova, E. (2007). "A simple non-destructive test of cellular activity (NTCA) for in vitro assessment of cancer cell chemosensitivity/resistance." *Anticancer Res*, 27(4b), 2331-2337.
- Netikova, I., Sedláčková, E., Konopásek, B., and L., P. (2009). "Therapy of palmar-plantar erythrodysesthesia after continual fluoropyrimidin administration with 10% uridin ointment (ASCO Meeting Abstract)." *Journal of Clinical Oncology*, 27(15S (May 20 Supplement)).
- Noordhuis, P., Holwerda, U., Van der Wilt, C. L., Van Groeningen, C. J., Smid, K., Meijer, S., Pinedo, H. M., and Peters, G. J. (2004). "5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers." *Ann Oncol*, 15(7), 1025-1032.
- Nord, L. D., Stolfi, R. L., and Martin, D. S. (1992). "Biochemical modulation of 5-fluorouracil with leucovorin or delayed uridine rescue. Correlation of antitumor activity with dosage and FUra incorporation into RNA." *Biochem Pharmacol*, 43(12), 2543-2549.
- O'Dwyer, P. J., King, S. A., Hoth, D. F., and Leyland-Jones, B. (1987). "Role of thymidine in biochemical modulation: a review." *Cancer Res*, 47(15), 3911-3919.



- Oka, Y., Naomoto, Y., Yasuoka, Y., Hatano, H., Haisa, M., Tanaka, N., and Orita, K. (1997). "Apoptosis in cultured human colon cancer cells induced by combined treatments with 5-fluorouracil, tumor necrosis factor-alpha and interferon-alpha." *Jpn J Clin Oncol*, 27(4), 231-235.
- Osswald, H., and Youssef, M. (1979). "Potentiation of the chemotherapeutic action of 5-fluorouracil by combination with cytidine or guanosine on HRS-sarcoma." *J Cancer Res Clin Oncol*, 93(3), 241-244.
- Ota, M., Tatsumi, K., Suwa, H., Watanabe, J., Watanabe, K., Osada, S., Tanaka, K., Shoichi, F., Ichikawa, Y., Kunisaki, C., and Endo, I. (2014). "The Effect of Pyridoxine for Prevention of Hand-Foot Syndrome in Colorectal Cancer Patients with Adjuvant Chemotherapy Using Capecitabine: A Randomized Study." *Hepatogastroenterology*, 61(132), 1008-1013.
- Peters, G. J., van der Wilt, C. L., van Groeningen, C. J., Smid, K., Meijer, S., and Pinedo, H. M. (1994). "Thymidylate synthase inhibition after administration of fluorouracil with or without leucovorin in colon cancer patients: implications for treatment with fluorouracil." *J Clin Oncol*, 12(10), 2035-2042.
- Peters, G. J., van Groeningen, C. J., Laurensse, E., Kraal, I., Leyva, A., Lankelma, J., and Pinedo, H. M. (1987). "Effect of pyrimidine nucleosides on body temperatures of man and rabbit in relation to pharmacokinetic data." *Pharm Res*, 4(2), 113-119.
- Pettersen, H. S., Visnes, T., Vagbo, C. B., Svaasand, E. K., Doseeth, B., Slupphaug, G., Kavli, B., and Krokan, H. E. (2011). "UNG-initiated base excision repair is the major repair route for 5-fluorouracil in DNA, but 5-fluorouracil cytotoxicity depends mainly on RNA incorporation." *Nucleic Acids Res*, 39(19), 8430-8444.
- Pritchard, D. M., Watson, A. J., Potten, C. S., Jackman, A. L., and Hickman, J. A. (1997). "Inhibition by uridine but not thymidine of p53-dependent intestinal apoptosis initiated by 5-fluorouracil: evidence for the involvement of RNA perturbation." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(5), 1795-1799.
- Reigner, B., Blesch, K., and Weidekamm, E. (2001). "Clinical pharmacokinetics of capecitabine." *Clin Pharmacokinet*, 40(2), 85-104.
- Sawyer, R. C., Stolfi, R. L., Spiegelman, S., and Martin, D. S. (1984). "Effect of Uridine on the Metabolism of 5-Fluorouracil in the CD8F 1 Murine Mammary Carcinoma System." *Pharm Res*, 1(2), 69-75.
- Schmoll, H. J., Van Cutsem, E., Stein, A., Valentini, V., Glimelius, B., Haustermans, K., Nordlinger, B., van de Velde, C. J., Balmana, J., Regula, J., Nagtegaal, I. D., Beets-Tan, R. G., Arnold, D., Ciardiello, F., Hoff, P., Kerr, D., Kohne, C. H., Labianca, R., Price, T., Scheithauer, W., Sobrero, A., Tabernero, J., Aderka, D., Barroso, S., Bodoky, G., Douillard, J. Y., El Ghazaly, H., Gallardo, J., Garin, A., Glynne-Jones, R., Jordan, K., Meshcheryakov, A., Papamichail, D., Pfeiffer, P.,

- Souglakos, I., Turhal, S., and Cervantes, A. (2012). "ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making." *Ann Oncol*, 23(10), 2479-2516.
- Schwartz, G. K., Christman, K., Saltz, L., Casper, E., Quan, V., Bertino, J., Martin, D. S., Colofiore, J., and Kelsen, D. (1996). "A phase I trial of a modified, dose intensive FAMTX regimen (high dose 5-fluorouracil+doxorubicin+high dose methotrexate+leucovorin) with oral uridine rescue." *Cancer*, 78(9), 1988-1995.
- Schwartz, P. M., Turek, P. J., Hyde, C. M., Cadman, E. C., and Handschumacher, R. E. (1985). "Altered plasma kinetics of 5-FU at high dosage in rat and man." *Cancer Treat Rep*, 69(1), 133-136.
- SPC\_Xeloda (2006). "Xeloda 150mg and 500mg Film-coated Tablets - Summary of Product Characteristics (SPC) - (eMC)." Roche Products Limited.
- Taguchi, T., Nakayama, T., Masuda, N., Yoshidome, K., Akagi, K., Nishida, Y., Yoshikawa, Y., Ogino, N., Abe, C., Sakamoto, J., and Noguchi, S. (2010). "Study of low-dose capecitabine monotherapy for metastatic breast cancer." *Chemotherapy*, 56(2), 166-170.
- Tan, W. L., Bhattacharya, B., Loh, M., Balasubramanian, I., Akram, M., Dong, D., Wong, L., Thakkar, B., Salto-Tellez, M., Soo, R. A., Fichtner, I., Iacopetta, B., and Soong, R. (2011). "Low cytosine triphosphate synthase 2 expression renders resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer." *Cancer Biol Ther*, 11(6), 599-608.
- Trave, F., Rustum, Y. M., Petrelli, N. J., Herrera, L., Mittelman, A., Frank, C., and Creaven, P. J. (1988). "Plasma and tumor tissue pharmacology of high-dose intravenous leucovorin calcium in combination with fluorouracil in patients with advanced colorectal carcinoma." *J Clin Oncol*, 6(7), 1184-1191.
- Umeda, M., and Heidelberger, C. (1968). "Comparative studies of fluorinated pyrimidines with various cell lines." *Cancer Res*, 28(12), 2529-2538.
- van Groeningen, C. J., Leyva, A., Kraal, I., Peters, G. J., and Pinedo, H. M. (1986). "Clinical and pharmacokinetic studies of prolonged administration of high-dose uridine intended for rescue from 5-FU toxicity." *Cancer Treat Rep*, 70(6), 745-750.
- van Groeningen, C. J., Peters, G. J., Leyva, A., Laurensse, E., and Pinedo, H. M. (1989). "Reversal of 5-fluorouracil-induced myelosuppression by prolonged administration of high-dose uridine." *J Natl Cancer Inst*, 81(2), 157-162.
- van Groeningen, C. J., Peters, G. J., Nadal, J. C., Laurensse, E., and Pinedo, H. M. (1991). "Clinical and pharmacologic study of orally administered uridine." *J Natl Cancer Inst*, 83(6), 437-441.
- van Groeningen, C. J., Peters, G. J., and Pinedo, H. M. (1992). "Modulation of fluorouracil toxicity with uridine." *Semin Oncol*, 19(2 Suppl 3), 148-154.

- van Groeningen, C. J., Peters, G. J., and Pinedo, H. M. (1993). "Reversal of 5-fluorouracil-induced toxicity by oral administration of uridine." *Ann Oncol*, 4(4), 317-320.
- Vogel, S. J., Presant, C. A., Ratkin, G. A., and Klahr, C. (1979). "Phase I study of thymidine plus 5-fluorouracil infusions in advanced colorectal carcinoma." *Cancer Treat Rep*, 63(1), 1-5.
- von Moos, R., Thuerlimann, B. J., Aapro, M., Rayson, D., Harrold, K., Sehouli, J., Scotte, F., Lorusso, D., Dummer, R., Lacouture, M. E., Lademann, J., and Hauschild, A. (2008). "Pegylated liposomal doxorubicin-associated hand-foot syndrome: recommendations of an international panel of experts." *Eur J Cancer*, 44(6), 781-790.
- Wan, L., Cao, D., Zeng, J., Yan, R., and Pizzorno, G. (2006). "Modulation of uridine phosphorylase gene expression by tumor necrosis factor-alpha enhances the antiproliferative activity of the capecitabine intermediate 5'-deoxy-5-fluorouridine in breast cancer cells." *Mol Pharmacol*, 69(4), 1389-1395.
- Wolf, S. L., Qin, R., Menon, S. P., Rowland, K. M., Jr., Thomas, S., Delaune, R., Christian, D., Pajon, E. R., Jr., Satele, D. V., Berenberg, J. L., and Loprinzi, C. L. (2010). "Placebo-controlled trial to determine the effectiveness of a urea/lactic acid-based topical keratolytic agent for prevention of capecitabine-induced hand-foot syndrome: North Central Cancer Treatment Group Study N05C5." *J Clin Oncol*, 28(35), 5182-5187.
- Wolpin, B. M., and Mayer, R. J. (2008). "Systemic Treatment of Colorectal Cancer." *Gastroenterology*, 134(5), 1296-1310.
- Wurzer, J. C., Tallarida, R. J., and Sirover, M. A. (1994). "New mechanism of action of the cancer chemotherapeutic agent 5-fluorouracil in human cells." *J Pharmacol Exp Ther*, 269(1), 39-43.
- Xeros, N. (1962). "Deoxyriboside control and synchronization of mitosis." *Nature*, 194, 682-683.
- Yamamoto, D., Iwase, S., Tsubota, Y., Ariyoshi, K., Kawaguchi, T., Miyaji, T., Sueoka, N., Yamamoto, C., Teramoto, S., Odagiri, H., Kitamura, K., Nagumo, Y., and Yamaguchi, T. (2015). "Randomized study of orally administered fluorinated pyrimidines (capecitabine versus S-1) in women with metastatic or recurrent breast cancer: Japan Breast Cancer Research Network 05 Trial." *Cancer Chemother Pharmacol*, 75(6), 1183-1189.
- Yen-Revollo, J. L., Goldberg, R. M., and McLeod, H. L. (2008). "Can inhibiting dihydropyrimidine dehydrogenase limit hand-foot syndrome caused by fluoropyrimidines?" *Clin Cancer Res*, 14(1), 8-13.
- Yentzer, B., Hick, J., Williams, L., Inabinet, R., Wilson, R., Camacho, F. T., Russell, G. B., and Feldman, S. R. (2009). "Adherence to a topical regimen of 5-fluorouracil, 0.5%, cream for the treatment of actinic keratoses." *Arch Dermatol/United States*, 203-205.
- Yucel, I., and Guzin, G. (2008). "Topical henna for capecitabine induced hand-foot syndrome." *Invest New Drugs*, 26(2), 189-192.

- Yun, J. A., Kim, H. C., Son, H. S., Kim, H. R., Yun, H. R., Cho, Y. B., Yun, S. H., Lee, W. Y., and Chun, H. K. (2010). "Oncologic outcome after cessation or dose reduction of capecitabine in patients with colon cancer." *J Korean Soc Coloproctol*, 26(4), 287-292.
- Zhang, R. X., Wu, X. J., Wan, D. S., Lu, Z. H., Kong, L. H., Pan, Z. Z., and Chen, G. (2012). "Celecoxib can prevent capecitabine-related hand-foot syndrome in stage II and III colorectal cancer patients: result of a single-center, prospective randomized phase III trial." *Ann Oncol*, 23(5), 1348-1353.

## 9. Seznam publikací spojených s disertační prací

### Články v odborných časopisech:

Hartinger J, Vesely P, Netikova I, E. Matoušková and L. Petruželka: The protective effect of pyrimidine nucleosides on human HaCaT keratinocytes treated with 5-FU, *Anticancer Res*, 2015, IF: 1,826

J. Hartinger, P. Veselý, E. Matoušková, S. Argalacsová, L. Petruželka, and I. Netíková: Local Treatment of Hand-Foot Syndrome with Uridine/Thymidine: In Vitro Appraisal on a Human Keratinocyte Cell Line HaCaT, *TSWJ*, 2012, IF: 1,73

J. Hartinger, I. Netíková, P. Veselý and E. Matoušková: Preklinické testy podporující léčbu palmární - plantární erythrodysesthesie 10% uridinovou mastí, *Onkologická farmacie*, 2012, (neindexovaný)

### Abstrakty:

J. Hartinger, I. Netíková, P. Veselý, Z. Kleibl, E. Matoušková, L. Petruželka: Protective effect of uridine on keratinocytes treated with fluoropyrimidines, *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 2010, IF: 0,064

### Postery:

19. NZW (28. - 30. 1. 2011 Hamburg, DE): J. Hartinger, I. Netíková, P. Veselý, E. Matoušková: THYMIDINE AND URIDINE PROTECTIVE EFFECT ON KERATINOCYTES TREATED WITH FLUOROPYRIMIDINES

ISOPP XII (5. - 8. 5. 2010 Praha, ČR): J. Hartinger, I. Netíková, P. Veselý, Z. Kleibl, E. Matoušková, L. Petruželka: PROTECTIVE EFFECT OF URIDINE ON KERATINOCYTES TREATED WITH FLUOROPYRIMIDINES



## **Presentace na kongresech, symposiích:**

63. ČESKO-SLOVENSKÉ FARMAKOLOGICKÉ DNY (13. 9. 2013, OLOMOUC, ČR): J. Hartinger: Protektivní účinek pyrimidinových nukleosidů a jejich kombinací na HaCaT keratinocyty v přítomnosti 5-FU: MTT, NTCA a RTCA testy.

8. pracovní den onkologické farmacie (24. 5. 2012 Praha, ČR): J. Hartinger: Výsledky preklinické studie pro léčbu hand-foot syndromu - protektivní účinek uridinu a thymidinu na buněčné linii keratinocytů HaCaT

20. NZW (27.-29. 1. 2012 Hamburg, DE): I. Netíková, J. Hartinger: Uridin in the Hand-Foot Syndrome Treatment

XXXV. Brněnské onkologických dny (21.-23. 4. 2011 Brno, ČR): J. Hartinger: PPE po fluoropyrimidinech a možnosti léčby uridinovou mastí

14. kongres nemocničních lékárníků (12. - 14. 11. 2010 Hradec Králové, ČR): Hartinger, J.: In vitro testy protektivního účinku uridinu na lidské keratinocyty při léčbě 5-fluorouracilem

## **10. Přílohy**